

Philipps



Universität
Marburg

Strukturelle und funktionelle Analyse
der PA14-artigen Adhäsinfamilie aus der Bäckerhefe
Saccharomyces cerevisiae

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nina Wozniak

aus Groß-Umstadt

Marburg/Lahn 2015

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2010 bis Mai 2015 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Manuskripte in Vorbereitung:

Wozniak, N., Kock, M., Steuber, H., Essen, L.O., and Mösch, H.U. (2015). Functional diversity of PA14-type adhesins of *Saccharomyces cerevisiae* is conferred by variation of a Flo family-specific subdomain.

Kock, M., Brückner, S., Wozniak, N., Veelders, M., Schlereth, J., Mösch, H.U., and Essen, L.O. (2015). Cea1: A member of a hitherto unknown subfamily of ascomycetal adhesins binds to chitin ends.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Strukturelle und funktionelle Analyse der PA14-artigen Adhäsinfamilie aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Nina Wozniak)

Abkürzungen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Abkürzungen nach dem Internationalen Einheitensystem („Système Internationale d’Unités“) und den daraus abgeleiteten Einheiten verwendet. Für Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code basierend auf der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ verwendet. Weitere spezielle Abkürzungen sind an den entsprechenden Textstellen erläutert.

°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
%	Prozent	mM	Millimolar
Abb.	Abbildung	ng	Nanogramm
bzw.	beziehungsweise	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
ca.	circa	nm	Nanometer
cm	Zentimeter	NaCl	Natriumchlorid
dH_2O	destilliertes Wasser	OD	Optische Dichte
ddH_2O	Reinstwasser	PDB	Engl. „Protein Data Bank“
DIC	<u>d</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> ontrast	PEG	Polyethylenglycol
DTT	Dithiothreitol	rpm	Drehzahl (revolutions per <u>m</u> inute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
e.g.	Lat. „exempli gratia“, zum Beispiel	SDS	Natriumdodecylsulfat
Em	Emission	Sek.	Sekunde/n
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum	sog.	sogenannte/n/r
et al.	Lat. „et alia“, und andere	Std.	Stunde
EtOH	Ethanol	Tab.	Tabelle
evtl.	eventuell	U	Units
Ex	„Excitation“, Anregung	μ	Mikro
g	Gramm	u.a.	unter anderem
g	g-Kraft (Vielfaches der normalen Erdbeschleunigung)	μ l	Mikroliter
ggf.	gegebenenfalls	V	Volt
ID	Identifikationsnummer	v. Chr.	vor Christus
IPTG	Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid	WL	„Wavelength“, Wellenlänge
K_d	Dissoziationskonstante	w/v	Massenprozent (weight/volume)
L	Liter	z. B.	zum Beispiel
M	Molar/e/em/er/es	ü. N.	über Nacht
mg	Milligramm		
Min.	Minute/n		

Zusammenfassung

Eine grundlegend wichtige Eigenschaft vieler Mikroorganismen ist ihre Fähigkeit, über Adhäsion mit der Umwelt zu interagieren. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verfügt zur Anheftung von Zellen an fremde Oberflächen über spezielle Zellwand-verankerte Adhäsine, Flokkuline genannt, welche zur großen Familie der pilzlichen Adhäsine gehören. Diese Oberflächenproteine ermöglichen auch soziale Interaktionen, wobei verschiedene mehrzellige Strukturen entstehen können, z. B. Flocken mit Schutzfunktion. Die Flokkuline bestehen aus drei typischen Domänen, wobei die N-terminale Domäne (A-Domäne) an der Zelloberfläche präsentiert wird und als eigentliche Adhäsionsdomäne fungiert. Die A-Domänen der meisten Flokkuline gehören aufgrund ihrer Struktur zu den PA14-artigen Proteinen und fungieren als Lektine, wobei vermutet wird, dass eine Flokkulin-spezifische Subdomäne (SD) eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Ligandbindungs-Selektivität spielt. Am Beispiel der Strukturen von Flo1A und Flo5A konnte bereits im Detail gezeigt werden, wie diese Adhäsine über Bindung von Zellwand-exponierten Mannosiden Zell-Zell-Interaktionen vermitteln.

Um die Struktur und Funktion der PA14-artigen Adhäsine von *S. cerevisiae* besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die A-Domänen der Flokkuline Flo1, Flo5, Flo9, und Flo10 aus verschiedenen Hefestämmen isoliert und mit Hilfe eines einheitlichen Expressionssystems bezüglich sozialer Interaktionen (Flokkulation) und Adhäsion an fremde Oberflächen (Agar) untersucht und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die meisten PA14-artigen FloA-Domänen Flokkulation und/oder Agar-Adhäsion vermitteln können, jedoch teilweise mit deutlich unterschiedlicher Effizienz und Spezifität. Zudem ergab diese Analyse Hinweise darauf, dass die Flokkulin-spezifische Subdomäne eine entscheidende Rolle bei der funktionalen Variabilität spielt. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden die Subdomänen der Flokkuline Flo5 und Flo10 gegeneinander ausgetauscht. Die anschließende funktionale Analyse ergab, dass dadurch auch die speziellen Adhäsionseigenschaften gegenseitig übertragen wurden. Zudem wurden die Kristallstrukturen von Flo10A und einer chimären Flo10A^{5SD}-Variante im Komplex mit Mannosid-Liganden gelöst und mit der Struktur von Flo5A verglichen. Diese Analyse zeigt den Einfluss der SD auf die Ligand-Bindungsspezifität auch auf atomarer Ebene. Insgesamt legt diese Arbeit nahe, dass *S. cerevisiae* mit der PA14-artigen Flokkulinfamilie über ein variables Adhäsion-repertoire verfügt, welches es diesem Mikroorganismus ermöglicht, seine Adhäsionseigenschaften stetig zu verändern und neuen Umweltbedingungen anzupassen.

Summary

Having the ability to interact with its environment by adhesion is a crucial important characteristic of many microorganisms. For being able to adhere to foreign surfaces, cells of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* possess special cell wall related adhesins, so-called flocculins that belong to the large family of fungal adhesins. Furthermore, these surface proteins enable social interactions where multicellular and protective structures like flocs are formed. Flocculins consist of three typical domains with the N-terminal domain (A-domain) being presented outside the cell wall and mediating all the adhesive properties. Based on their structural features, most of the flocculin A-domains belong to the PA14-like proteins and are classified as lectins. It is supposed that sugar binding by the FloA-domains depends on a flocculin specific subdomain (SD), which mediates ligand specificity. By using the example of the Flo1A and Flo5A structures it could be shown in detail how these adhesins are mediating cell-cell interactions by binding mannosides in the cell walls of neighbouring cells.

In order to better understand the structure and function of the PA14-like adhesins of *S. cerevisiae*, the Flo1, Flo5, Flo9, and Flo10 A-domains have been isolated out of different yeast strains. By using a standardised expression system their adhesion properties to other cells and to foreign surfaces could be subsequently analysed and compared to each other. Thereby it showed that most of the PA14-like flocculins are able to mediate cell-cell and agar adhesion, but with clearly different efficiency and specificity. Furthermore the results indicate that the flocculin specific subdomain is crucial for functional variability. To confirm this hypothesis the subdomains of Flo5A and Flo10A have been swapped. The following functional analysis of the chimeric FloA-domains revealed that their adhesion properties largely could be attributed to the subdomain. In addition, Flo10A and the chimeric Flo10A^{5SD}-domain have been crystallised in complex with mannoside ligands and compared to the structure of Flo5A. This analysis shows the influence of the subdomain on ligand binding specificity even on an atomic scale. In summary this work suggests that the PA14-like flocculin-family represents a variable adhesin-reservoir which enables *S. cerevisiae* to constantly change its adhesion properties and adapt to changing environmental conditions.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Abkürzungen	II
Zusammenfassung	III
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	9
1.1 Bedeutung von <i>S. cerevisiae</i> in der Lebensmittelindustrie und Grundlagenforschung	9
1.2 Der Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i>	10
1.3 Der Aufbau der Hefezellwand	13
1.4 Vegetative Adhäsion in <i>S. cerevisiae</i> wird durch Flokkuline vermittelt	15
1.4.1 Adhäsine in <i>S. cerevisiae</i>	15
1.4.2 Phänotypische Interaktionen der Hefezelle mit ihrer Umwelt, basierend auf der Aktivität von Flokkulinen	17
1.4.3 Regulation der Flokkulin-Expression	18
1.4.4 Aufbau der Adhäsine in <i>S. cerevisiae</i>	20
1.4.5 Die Adhäsionsdomäne der PA14-artigen Flokkuline	22
1.5 Weitere Hefe-Adhäsine	26
1.6 Fragestellung	29
2. Ergebnisse	30
2.1 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der PA14-artigen FloA-Domänen	30
2.1.1 Expression der verschiedenen <i>FLOA</i> -Domänen	30
2.1.2 Vermittlung von Zell-Zell Adhäsion durch verschiedene FloA-Domänen	33
2.1.3 Messung der Agar-Adhäsion verschiedener FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c	36
2.2 Analyse der Subdomänen von Flo5A und Flo10A	39
2.2.1 Herstellung und Expression von Flo5A- und Flo10A-Varianten mit verschiedenen Subdomänen	39
2.2.2 Vermittlung von Zell-Zell Adhäsion durch FloA-Domänen ohne Subdomäne und durch chimäre FloA-Domänen	41

2.2.3	Messung der Agar-Adhäsion, welche durch FloA-Domänen ohne Subdomäne und durch chimäre FloA-Domänen vermittelt wird	44
2.3	Biochemische Analyse ausgewählter FloA-Domänen	46
2.3.1	Bestimmung von Ligandenbindungskonstanten mittels Fluoreszenz-Spektroskopie	46
2.3.2	Kristallisation von Flo10A	51
2.3.3	Kristallisation von Flo10A ^{5SD}	54
2.4	Strukturelle und funktionelle Variabilität PA14-artiger FloA-Domänen aus <i>Saccharomyces</i> -Stämmen unterschiedlicher Herkunft	57
2.4.1	Hintergrund zur Variabilitätsanalyse der FloA-Domänen	57
2.4.2	Isolierung und bioinformatische Analyse der FloA-Domänen	58
2.4.3	Funktionale Analyse mit Hilfe von ausgewählten FloA-Domänen	68
3.	Diskussion	83
3.1	Funktionale Variabilität der PA14-artigen Flo-Adhäsionsdomänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c	83
3.1.1	Flokkulation	83
3.1.2	Agar-Adhäsion	85
3.2	Die Funktion der PA14-artigen FloA-Domänen ist abhängig von der Anwesenheit und Art der Subdomäne	87
3.2.1	Die Subdomäne als funktionsvermittelnde Untereinheit der FloA-Domänen	87
3.2.2	Die PA14-artigen FloA-Domänen stellen eine optimierte Version für ihre <i>in vivo</i> Funktion dar	89
3.3	Die sequenzielle und funktionale Variabilität der PA14-artigen Flo-Adhäsionsdomänen	92
3.3.1	Phylogenetische Analyse der Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen	92
3.3.2	Die sequenzielle Variabilität der Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen	93
3.3.3	Rekombination findet nicht nur über die mittlere B-Domäne, sondern auch innerhalb der FloA-Domänen statt	94
3.3.4	Die PA14-artigen FloA-Domänen stellen eine funktional hoch diverse Adhäsinfamilie dar	97
3.4	Ausblick	104
4.	Material	106
4.1	Geräte und Programme	106

4.2	Verbrauchsmaterialien	109
4.3	Chemikalien	109
4.4	Enzyme, Größenstandards und Kits	110
4.5	Puffer und Nährmedien	110
4.6	Polyacrylamid- und Agarosegele	114
4.7	Antibiotika	115
4.8	Antikörper	116
4.9	Oligonukleotide	116
4.10	Synthese von chimären <i>FLOA</i> -Domänen	125
4.11	Stämme und Plasmide	125
4.11.1	<i>E. coli</i> -Stämme	125
4.11.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	126
4.11.3	Plasmide	130
5.	Methoden	159
5.1	Kultivierung der Mikroorganismen	159
5.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	159
5.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	159
5.2	Manipulation von Nukleinsäuren	159
5.2.1	Isolation von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> [Hoffman and Winston, 1987]	159
5.2.2	PCR Amplifikation von Nukleinsäuren	160
5.2.3	DNA-Restriktion mit Hilfe von Endonukleasen	161
5.2.4	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	162
5.2.5	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	162
5.2.6	DNA-Ligation	163
5.3	Manipulation von Mikroorganismen	163
5.3.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	163
5.3.2	Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	164
5.4	Analytische Methoden zur Überprüfung von Nukleinsäuren	165
5.4.1	Quantitative und qualitative Messung von DNA am Spektrophotometer	165
5.4.2	Sequenzierung	165
5.5	Stammhaltung in Glycerin-Dauerkulturen	166
5.6	Funktionale Analyse der FloA-Domänen	166
5.6.1	Fluoreszenzmikroskopie	166

5.6.2	Flokkulationstest zur Verifizierung der Zell-Zell Adhäsion [Bester <i>et al.</i> , 2006]	167
5.6.3	Waschtest zur Verifizierung der Zell-Oberflächen Adhäsion [Roberts and Fink, 1994]	168
5.7	Phylogenetische Analyse von FloA-Domänen	168
5.8	Proteinchemische Methoden	169
5.8.1	Bedingungen für die Proteinsynthese in <i>E. coli</i>	169
5.8.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	169
5.8.3	Aufreinigung über His-Taq mit Hilfe einer NiNTA-Säule	170
5.8.4	Aufkonzentrieren von Proteinen / Pufferwechsel	170
5.8.5	Größensortierung von Proteinen über Gelfiltration	170
5.9	Proteinanalyse	171
5.9.1	Quantitative Analyse am Spektrophotometer	171
5.9.2	Qualitative Analyse mit Hilfe von SDS-PAGE	171
5.9.3	Funktionale Analyse am Spektrofluorometer	172
5.10	Kristallisation von Proteinen	175
5.10.1	Vorbereitung der Proteine für die Kristallisation	175
5.10.2	Auspipettieren der Proteine mit Kristallisationsbedingungen	176
5.10.3	Röntgenbeugung und Strukturlösung	176
6.	Literatur	178
	Ein ganz großes Dankeschön an...	190
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Anhang	192

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von *S. cerevisiae* in der Lebensmittelindustrie und Grundlagenforschung

Saccharomyces cerevisiae ist ein vorwiegend einzelliger, eukaryotischer Mikroorganismus, welcher unter den Pilzen zur Abteilung der Ascomycota gehört. Seine volksumdliche Bezeichnung als „Bäckerhefe“ hebt bereits seine Bedeutung für den Menschen in der Lebensmittelherstellung hervor. Diese beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Herstellung von Backwaren. *S. cerevisiae* wird auch zur Produktion alkoholischer Getränke wie Wein und Bier verwendet. Die erste nachgewiesene Nutzung der Gäreigenschaften von Hefen wurde auf einen Zeitpunkt um bereits 7000 v. Chr. geschätzt, und basiert auf molekularen Analysen von Töpfereigefäßen welche in einem jungsteinzeitlichen Dorf in China gefunden wurden (McGovern *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass Hefen zunächst der Herstellung von Wein dienten. Durch diese bereits sehr lange zurückreichende und intensive menschliche Nutzung stellt sich die Frage nach dem Status von *S. cerevisiae* als domestizierter oder nicht-domestizierter Organismus. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in einer Studie die DNA-Sequenzvariation an unterschiedlichen Loci von verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen ermittelt, welche sowohl aus kommerziellen wie auch aus natürlichen Quellen stammten (Fay and Benavides, 2005). Die anschließende phylogenetische Auswertung der Sequenzen führte zu dem Schluss, dass *S. cerevisiae* insgesamt keine domestizierte Spezies darstellt. Dagegen können einzelne Stämme als domestiziert eingestuft werden. Neben der Verwendung von *S. cerevisiae* in der Lebensmittelindustrie dient diese zusammen mit anderen Hefen auch als eukaryotischer Modellorganismus in der Grundlagenforschung (Kucharczyk and Rytka, 2001; De Freitas *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). Dabei sprechen gleich mehrere Vorteile für die experimentelle Forschung mit Hilfe von Hefen. Zum einen können die benötigten Nährmedien vergleichsweise kostengünstig hergestellt werden. Dazu kommen relativ kostengünstige und einfach durchzuführende genetische Manipulationsmöglichkeiten, welche es beispielsweise ermöglichen die Funktion einzelner Gene, bzw. den Effekt von Mutationen, genauer zu untersuchen (Game, 2002). Diese Eigenschaft ist besonders interessant, da für viele Gene aus Hefe entsprechend homologe Gene in Säugetiergenomen zu finden sind. Dadurch ist es möglich, bereits gewonnene Erkenntnisse, beispielsweise zur Funktion eines Hefe-Genes, auf das homologe Gen eines Säugetieres zu übertragen. Das beste Beispiel hierfür ist das *RAS*-Gen, welches sowohl in Hefe als auch in Säugetieren zu finden ist. Dass in

diesem Fall die Funktion der jeweiligen Proteine vergleichbar ist konnte dadurch gezeigt werden, dass *H-ras* aus dem Genom eines Säugetieres, welches in einem *ras*-deletiertem Hefestamm exprimiert wird, in der Lage ist den Verlust der entsprechenden Hefegene *RAS1* und *RAS2* zu kompensieren (Botstein *et al.*, 1997). Nicht zuletzt spricht die Sequenzierung des gesamten Genoms von *S. cerevisiae* im Jahr 1996, und stetig weiter dazukommende Genomsequenzen verschiedener Hefen, für die Verwendung dieses Organismus als eukaryotischer Modellorganismus (Goffeau *et al.*, 1996). Dabei eröffnet aber gerade auch die Weiterentwicklung der Sequenziermethoden, sowie die Sequenzierung und der Vergleich ganzer Genome ein weiteres Forschungsfeld, nämlich das der „Phylogenomik“. Als Beispiel einer phylogenomischen Analyse mit Hilfe von *S. cerevisiae* wurde der Verwandtschaftsgrad zwischen verschiedenen Stämmen bestimmt, welche aus unterschiedlichsten geographischen Quellen stammten (Liti *et al.*, 2009). Letztendlich konnten durch den genomweiten Vergleich dieser Stämme fünf Verwandtschaftsgruppen definiert werden, welche auch geographisch voneinander isoliert sind. Dazwischen befinden sich Stämme, welche eine Mischung aus diesen darstellen, was wiederum auf die Nutzung und Verbreitung von *S. cerevisiae* durch den Menschen und die dadurch erleichterte Kreuzung von Stämmen untereinander zurückzuführen ist.

1.2 Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae*

Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae* besteht im Wesentlichen aus drei grundlegenden Vorgängen (Herskowitz, 1988). Dazu zählt zunächst (1) die Zellproliferation, bei der ausgehend von einer Zelle durch Wachstum und Zellteilung zwei identische Tochterzellen hergestellt werden. Dazu kommt (2) die Paarung zweier haploider Zellen unter Entstehung einer diploiden Zygote. Diploide Zellen können wiederum (3) durch Meiose und der Bildung von Sporen in den haploiden Zustand zurückkehren. In Abb. 1.1 sind diese Zellzustände und ihr Zusammenhang im Lebenszyklus von *S. cerevisiae* schematisch dargestellt. Während der mitotischen Zellteilung wird von der Mutterzelle eine Tochterzelle gebildet. Dies erfolgt durch die Duplikation des Genoms und die gleichmäßige Verteilung der Chromosomensätze zwischen Mutter und Tochterzelle. Dabei sind die beiden Zellen durch einen Aktinomyosinring verbunden, dessen Position durch zwei zunächst zusammenhängende Septinringe stabilisiert wird. Nach der Chromosomensegregation erfolgt die Abtrennung der Tochterzelle von der

Mutterzelle, indem die beiden Septinringe voneinander getrennt werden, und sich der Aktinomyosinring zusammenzieht. Gleichzeitig wird durch die Aktivität von Chitin-Synthasen ein primäres Septum zwischen den beiden Zellen aufgebaut welches, nachdem sowohl Mutter als auch Tochterzelle jeweils sekundäre Septen gebildet haben, wiederum durch Chitinasen abgebaut wird was letztendlich zur Trennung der Tochterzelle von der Mutterzelle führt (Howell and Lew, 2012).

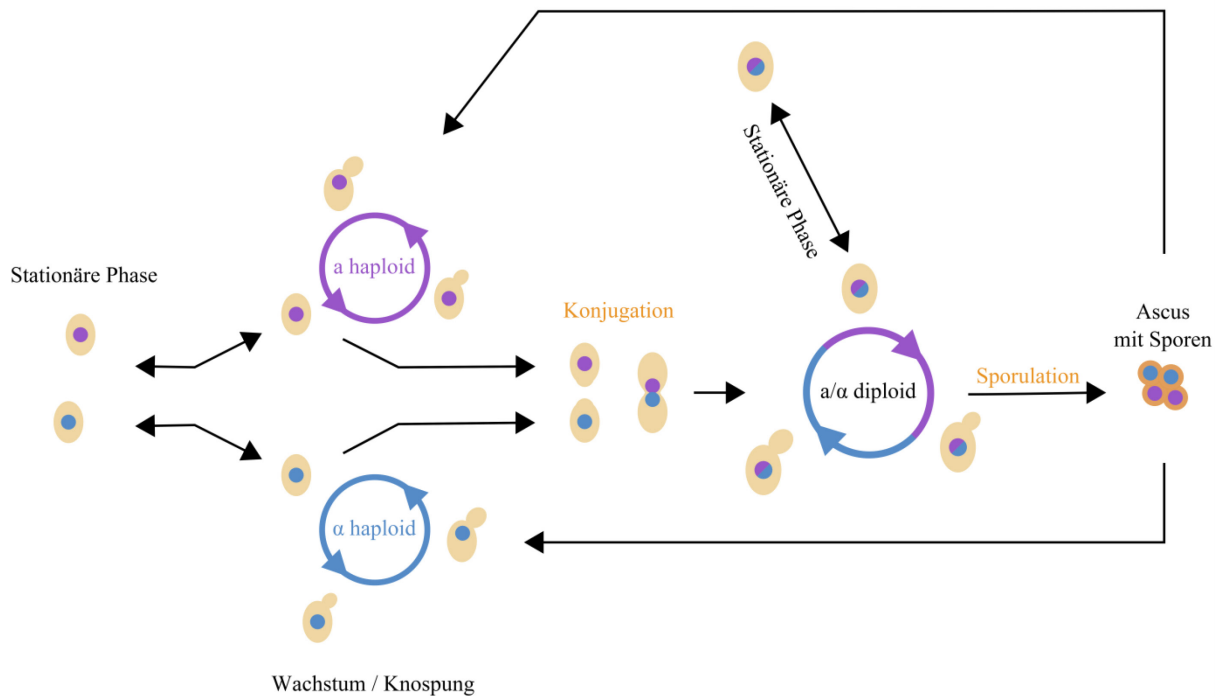


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae* beinhaltet sowohl eine haploide, als auch eine diploide Phase. Der Übergang von haploiden zu diploiden Zellen erfolgt durch Konjugation zweier Zellen mit jeweils unterschiedlichem Paarungstyp. Wie bereits im haploiden Zustand können sich diploide Zellen anschließend durch Knospung unter Ausbildung einer identischen Tochterzelle weiter vermehren. Tritt jedoch beispielsweise Nährstoffmangel auf, kommt es in diploiden Zellen zur Einleitung der Meiose, bei der jeweils vier Sporen gebildet werden welche sich zusammen in einem Ascus befinden. Durch diesen Vorgang der Sporulation erfolgt erneut der Übergang von der diploiden zur haploiden Lebensphase.

Dieser Zyklus kann anschließend weitergeführt aber auch unterbrochen werden, nämlich dann, wenn zwei Zellen unterschiedlichen Paarungstyps in räumliche Nähe zueinander gelangen. Beide Zellen kommunizieren dabei über Pheromone miteinander, welche spezifisch für den jeweiligen Paarungstyp sind, die a- und α-Faktoren (Duntze *et al.*, 1970; Wilkinson and Pringle, 1974; Kurjan and Herskowitz, 1982). Der zum eigenen Paarungstyp entgegengesetzte Faktor wird auf der Zelloberfläche gebunden, und löst dadurch ein Signal im Inneren der Zelle aus, was zu gleich mehreren Reaktionen führt. Zum einen arretieren die Zellen in der G1-Phase ihres Zellzyklus. Des Weiteren wird die Synthese von Proteinen

eingeleitet, welche sowohl für die Zell-, als auch für die Kernfusion benötigt werden (Rose *et al.*, 1986, McCaffrey *et al.* 1987; Trueheart *et al.*, 1987). Die aus der Zellfusion resultierenden diploiden Zellen können sich anschließend mit Hilfe der bereits beschriebenen Knospung weiter vermehren. Unter bestimmten restriktiven Umweltbedingungen, wie dem Fehlen einer Kohlenstoffquelle und/oder unter Stickstoffmangel, können die Zellen aber auch die Meiose und damit die sog. Sporulation einleiten (Esposito and Klapholz, 1981; Mitchell, 1988). Dabei befinden sich jeweils vier Sporen in einem Ascus, von denen jede von einer Sporenhülle umgeben ist welche ihr eine gewisse Resistenz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen verleiht (Briza *et al.*, 1990; Pammer *et al.*, 1992; Coluccio *et al.*, 2004). Nach dem Keimen erfolgt dann erneut die Vermehrung der nun haploiden Zellen durch Knospung.

Eine weitere, bisher nicht genannte Besonderheit welche innerhalb des Lebenszyklus von *S. cerevisiae* stattfinden kann, ist die homothallische Vermehrung. In dem bisher beschriebenen heterothallischen Lebenszyklus bilden zwei Zellen unterschiedlichen Paarungstyps eine diploide Zelle. Bei dem homothallischen Lebenszyklus ist eine haploide Zelle in der Lage ihren Paarungstyp zu ändern, woraus Nachkommen hervorgehen welche jeweils unterschiedliche Paarungstypen haben und die miteinander diploide Zellen bilden können. Der einzige Unterschied zwischen heterothallischen und homothallischen Stämmen liegt in dem sog. *HO*-Gen (Homothallismus). Zellen welche sich homothallisch Vermehren besitzen ein intaktes Gen, während heterothallische Zellen die defekte *ho*-Version in ihrem Genom beinhalten (Hawthorne, 1963; Hicks and Herskowitz, 1976). In der Natur finden sich sowohl homothallische als auch heterothallische *S. cerevisiae*-Stämme. Laborstämme sind dagegen ausschließlich heterothallisch.

Neben dem einzelligen Wachstum wie es in Abb. 1.1 beschrieben ist, können *S. cerevisiae*-Zellen darüber hinaus auch zu mehrzelligem Wachstum übergehen. Diese Wachstumsformen sind in Abschnitt 1.4.2 näher beschrieben und beruhen auf der Aktivität von Adhäsinen, welche sich in der Zellwand von *S. cerevisiae* befinden (Abb. 1.2). Im nachfolgenden Abschnitt 1.3 wird daher zunächst der Aufbau der Hefe-Zellwand erläutert und wie die Adhäsine in diese eingegliedert sind.

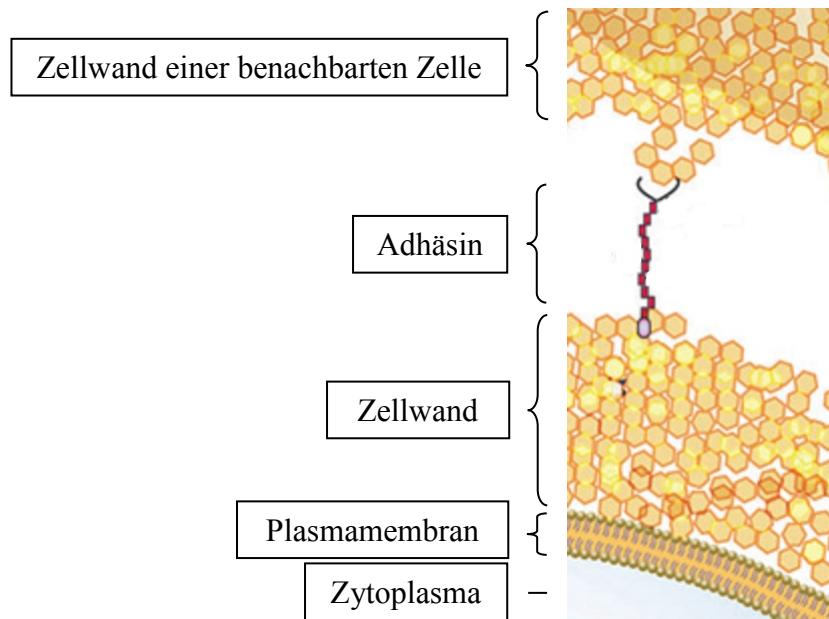


Abb. 1.2: Adhäsins in der Zellwand von *S. cerevisiae*. Mit Hilfe dieser Zellwandproteine findet die Adhäsion an verschiedene biotische und abiotische Oberflächen statt. Dadurch kommt es zur Ausprägung von unterschiedlichen mehrzelligen Wachstumsformen wie beispielsweise die Bildung von Flocken in flüssigem Milieu, oder dem Aufbau eines Biofilms (Aus Verstrepen and Klis, 2006).

1.3 Der Aufbau der Hefezellwand

Ausgehend von der Plasmamembran setzt sich die Zellwand von *S. cerevisiae* aus drei Hauptkomponenten zusammen: dem Chitin, dem β -Glucan, und den Glykoproteinen. Diese sind innerhalb der Zellwand in verschiedenen Schichten zu finden (Abb. 1.3). Die erste Schicht besteht aus β -1,4-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten, welche zusammen die Chitinschicht bilden. Die größte Menge an Chitin befindet sich dabei im primären Septum zwischen Mutter und Tochterzelle, sowie nach der Knospung in der „Knospungs-Narbe“ (Cabib and Bowers, 1971; Molano *et al.*, 1980). Neben freiem Chitin kann dieses auch mit verschiedenen Glucanen und Mannanen direkt oder indirekt verbunden sein, welche die zweite Zellwandschicht ausmachen. Eine direkte Verknüpfung wurde beispielsweise zwischen Chitin und β -1,3-Glucan nachgewiesen. In dieser Form ist es hauptsächlich in einem Ring, welcher die Verbindungsstelle zwischen Mutter und Tochterzelle umschließt, zu finden. In der lateralen Zellwand finden dagegen weitere Verknüpfungen mit β -1,6-Glucan statt, welches wiederum mit Glucan oder Mannan verbunden ist (Abb. 1.3; Cabib and Duran, 2005; Cabib 2009).

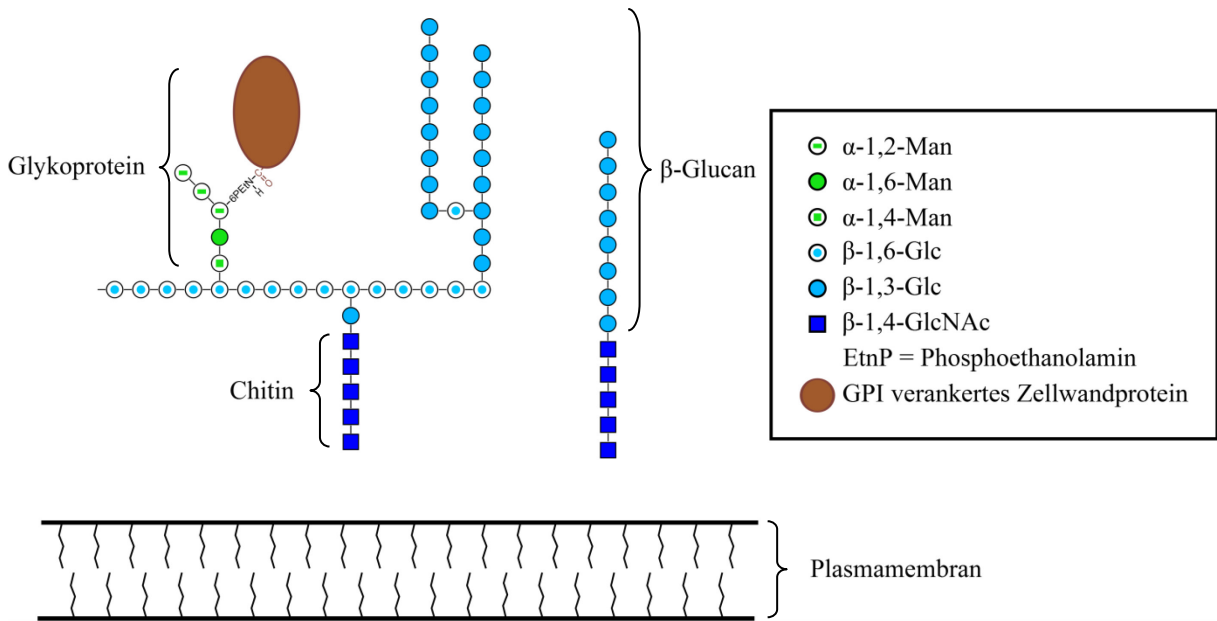


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau der Hefezellwand. Die drei Hauptkomponenten aus denen sich die Zellwand von *S. cerevisiae* zusammensetzt sind Chitin, β -Glucan, sowie verschiedene Glykoproteine (Abgeleitet aus Orlean, 2012).

Neben dieser Grundstruktur, bestehend aus Polysacchariden, sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der Hefezellwand die Zellwandproteine, welche selbst eine hohe Anzahl an Polysaccharid-Seitenketten tragen und in Folge dessen auch als Glykoproteine bezeichnet werden. Basierend auf ihrer Funktion können drei Gruppen an Zellwandproteinen unterschieden werden: (1) Proteine welche zur Verknüpfung der einzelnen Zellwandkomponenten beitragen wie Hydrolasen und Transglykosidasen, (2) nicht-enzymatische Proteine wie Flokkuline und Agglutinine, und (3) Proteine, welche die Zellwand einmal durchspannen und als Sensoren für Zellwandstress dienen (Klis *et al.*, 2006, 2010; Dranginis *et al.*, 2007; Goossens and Willaert, 2010; Rodicio and Heinisch 2010; Levin 2011). Die Glykosylierung dieser Proteine kann entweder über die Seitenkette von Asparagin erfolgen (N-Glykosylierung), oder über die Seitenketten von Serin und Threonin (O-Glykosylierung). Eine weitere Modifikationsmöglichkeit besteht in der Verknüpfung einzelner Proteine mit einem GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker. Die Anbringung des ersten Saccharids / Oligosaccharids, bzw. des GPI-Ankers, an das jeweilige Protein erfolgt im ER-Lumen. Im Falle der N-Glykosylierung wird dabei zunächst ein verzweigtes Oligosaccharid, bestehend aus 14 Saccharideinheiten, auf eine Asparaginseitenkette übertragen. Ein bevorzugtes Sequenzmotiv hierfür ist Asp-X-Ser/Thr, bei dem X eine beliebige Aminosäure außer Prolin darstellt. In einer massenspektrometrischen Analyse

konnte die Glykosylierungswahrscheinlichkeit dieses Motivs auf 85 % bestimmt werden (Schulz and Aebi, 2009). Bei der O-Glykosylierung wird im ER-Lumen lediglich ein Mannosezucker an Serin oder Threonin gebunden. Nach dem Transport in den Golgi-Apparat werden sowohl N- als auch O-glykosydisch verknüpfte Saccharide weiter prozessiert, indem bei der N-Glykosylierung entweder eine Man_{10-14} Struktur, oder Mannoseketten mit 150-200 Saccharideinheiten an die bereits vorhandene Zuckerstruktur angefügt werden (Ballou, 1990; Orlean, 1997; Jigami, 2008). Bei der O-Glykosylierung werden bis zu vier weitere Mannosezucker hinzugefügt (Lussier *et al.*, 1999). Proteine, welche eine GPI-Signalsequenz beinhalten, werden im ER-Lumen mit einem Man_4GPI -Vorläufer versehen. Dessen Lipidanker und Zuckerkomponenten werden bereits im ER weiter modifiziert, was u.a. essentiell für den erfolgreichen Transport in den Golgi-Apparat ist (Fujita and Kinoshita, 2010). Dort kann eine weitere Mannose mit Man_4 verknüpft werden, was bei etwa 20-30 % aller GPI-Proteine der Fall ist (Fankhauser *et al.*, 1993; Sipos *et al.*, 1995; Pittet and Conzelmann, 2007). Nach dem Erreichen der Plasmamembran wird der Anker schließlich teilweise entfernt, und das Protein über Transglykosylierung mit dem β -1-6-Glucan der Zellwand verbunden (Abb. 1.3).

Trotz dieses insgesamt hierarchischen Aufbaus der Hefezellwand, insbesondere der Polysaccharidstruktur, stellt diese keineswegs eine statische Struktur dar. Vielmehr können sowohl die vorhandenen Mengen als auch die Lokalisation einzelner Komponenten variieren, was z.B. abhängig ist von dem Zellzyklusstadium, Zellstress, oder dem Nährstoffangebot. Als Beispiel konnte ein erhöhter Chitingehalt bei Zellen des Paarungstyps α nachgewiesen werden, welche dem α -Pheromon ausgesetzt waren (Schekman and Brawley, 1979; Orlean *et al.*; 1985).

1.4 Vegetative Adhäsion in *S. cerevisiae* wird durch Flokkuline vermittelt

1.4.1 Adhäsine in *S. cerevisiae*

Um es der einzelnen *S. cerevisiae*-Zelle zu ermöglichen mit ihrer Umwelt interagieren zu können, sei es mit anderen Hefezellen oder mit verschiedenen Substraten, befinden sich spezialisierte Oberflächenproteine in der Zellwand. Diese Adhäsine fasst eine Gruppe von Proteinen zusammen, die einander im grundlegenden Aufbau sehr ähneln, und welche für die unterschiedlichsten Adhäsionsvorgänge benötigt werden (Verstrepen *et al.*, 2004; Brückner

and Mösch, 2012). Die bereits im Lebenszyklus beschriebene Zellfusion zweier Zellen wird beispielsweise durch Agglutinine ermöglicht. Jede der beiden Zellen exprimiert dabei ein seinem Paarungstyp entsprechendem Agglutinin, das sog. a- bzw. α -Agglutinin (Terrance and Lipke, 1981). Beide werden über einen GPI-Anker mit der Zellwand verknüpft (Caro *et al.*, 1997). Während das α -Agglutinin (Sag1) aber nur aus einem Protein besteht, setzt sich das a-Agglutinin aus einer Adhäsions- und einer Ankerdomäne zusammen (Aga2 und Aga1). Bei der heterophilen Bindung zwischen a- und α -Agglutinin dient der C-terminale Bereich der a-Agglutinin Adhäsionsdomäne als Bindestelle für das α -Agglutinin (Cappellaro *et al.*, 1994). Beim α -Agglutinin findet die Bindung im N-terminalen Bereich des Proteins statt (Wojciechowicz *et al.*, 1993). Neben den Agglutininen hängt die erfolgreiche Zellfusion zweier Zellen noch von einem weiteren Adhäsine, Fig2, ab. Dieses gehört wie die Agglutinine zu den Pheromon-induzierten Proteinen, wird aber wie auch Aga1 in Zellen beider Paarungstypen exprimiert. Zusätzlich zur bereits beschriebenen Adhäsion zwischen Aga2 und Sag1 vermittelt Fig2 im Verlauf der Agglutination sowohl die Bindung an Aga1 von benachbarten Zellen, als auch homophile Adhäsion (Huang *et al.*, 2009). Abgesehen von den Agglutininen und Fig2 beinhaltet das Genom von *S. cerevisiae* noch weitere Gene für Adhäsine, welche mehrzelliges Wachstum durch Zell-Zell- und Zell-Oberflächen Adhäsion ermöglichen. Da diese Art der Adhäsion u.a. die Bindung von vegetativen Zellen aneinander beinhaltet, wodurch diese als Flocken ausfallen, werden die entsprechenden Adhäsine auch als Flokkuline bezeichnet. In *S. cerevisiae* gibt es mindestens fünf Gene für Flokkuline; *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* und *FLO11*. Ihre Expression unterliegt jedoch sowohl genetischen als auch epigenetischen Regulationsmechanismen (Halme *et al.*, 2004, Abschnitt 1.4.3). Dies ist u.a. durch die subtelomere Lage der *FLO1* (Chr. I), *FLO5* (Chr. VIII), *FLO9* (Chr. I) und *FLO10* (Chr. XI)-Gene bedingt (Teunissen *et al.*, 1993; Dujon *et al.*, 1994; Teunissen *et al.*, 1995; Bussey *et al.*, 1995; Teunissen and Steensma, 1995). *FLO11* auf Chr. IX befindet sich dagegen weder im telomeren Bereich noch nahe am Centromer (Lo and Dranginis, 1996). *FLO1*, *FLO5* und *FLO9* weisen eine starke Ähnlichkeit in ihrer Sequenz auf, während *FLO10* mit diesen zwar noch vergleichbar ist, jedoch teilweise starke Abweichungen beinhaltet. *FLO11* besitzt dagegen eine völlig andersartige Proteinsequenz. Auch die Flokkuline gehören, wie die Agglutinine, zu den GPI-verknüpften Zellwandproteinen von *S. cerevisiae* (Caro *et al.*, 1997).

1.4.2 Phänotypische Interaktionen der Hefezelle mit ihrer Umwelt, basierend auf der Aktivität von Flokkulinen

Durch die Aktivität der Flo-Proteine in der Zellwand von *S. cerevisiae* wird es der Zelle ermöglicht, sowohl an benachbarte Hefezellen als auch an verschiedene biotische und abiotische Substrate zu binden (Abb. 1.4).

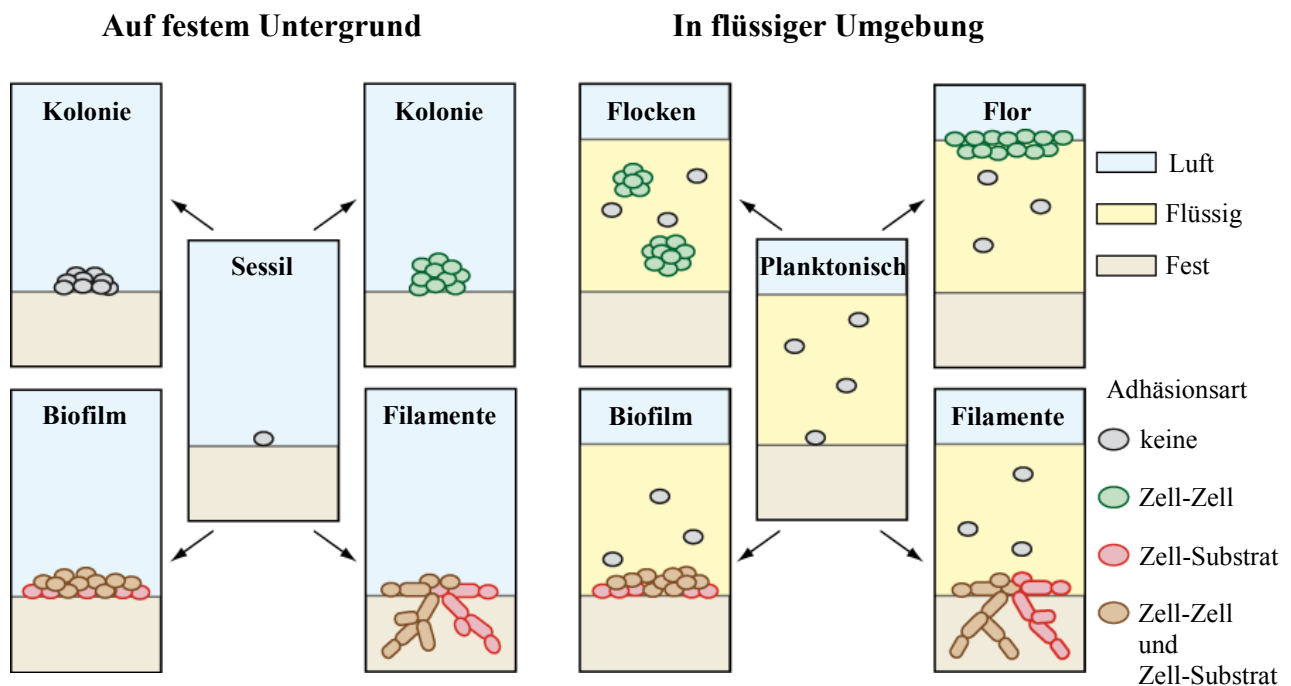


Abb. 1.4: Verschiedene Adhäsionsmöglichkeiten für *S. cerevisiae*-Zellen welche durch Flokkuline vermittelt werden, und ihre makroskopischen Erscheinungsformen. Die Adhäsion an benachbarte Zellen ermöglicht es *S. cerevisiae* in flüssigem Milieu Flocken zu bilden, welche zu Boden sinken, oder zur Oberfläche aufsteigen. Diese Formen der Zell-Zell Adhäsion werden als Flokkulation, bzw. Florbildung bezeichnet. Darüber hinaus können aneinander adhärierende Zellen auf einer Oberfläche aufliegend eine Kolonie bilden, welche jedoch nicht an der Oberfläche haftet. Bei der Bildung eines Biofilmes wird dagegen eine Verbindung mit der Oberfläche durch die angrenzenden Zellen hergestellt. In diploiden Zellen kann es darüber hinaus zu filamentösem, invasivem Wachstum durch Pseudohyphen kommen (Abbildung übernommen aus Brückner and Mösch, 2012).

Bei der Anheftung der Zellen untereinander kommt es in flüssiger Umgebung zur Ausbildung von Flocken, welche anschließend entweder zu Boden sinken, oder aber zur Flüssigkeitsoberfläche aufsteigen wenn genügend CO_2 in den Flocken eingeschlossen wird (Zara *et al.*, 2005). Diese Eigenschaft der Flokkulation, bzw. der Florbildung, ist insbesondere bei Hefestämmen in der industriellen Produktion erwünscht, da es eine kostengünstige

Methode darstellt um die Zellen vom Produkt zu trennen (Bauer *et al.*, 2010). Für die Zellen welche sich innerhalb der Flocken befinden stellt dies jedoch einen Schutzmechanismus dar um sich vor schädlichen äußeren Umwelteinflüssen zu schützen (Smukalla *et al.*, 2008). Alle fünf der bisher beschriebenen Flokkuline in *S. cerevisiae* sind in der Lage Zell-Zell Adhäsion zu vermitteln. Um an zellfremden Oberflächen haften zu können, bedarf es nach bisherigen Erkenntnissen allerdings der Aktivität von Flo11 oder Flo10 (Guo *et al.*, 2000). Bei haploiden *S. cerevisiae*-Zellen werden durch die Oberflächen-Adhäsion Biofilme gebildet. Diploide Zellen können zudem durch die Ausbildung von Pseudohyphen zu filamentösem, invasivem Wachstum übergehen, was es ihnen u.a. ermöglicht neue Nahrungsquellen zu erschließen. Diese Wachstumsform beinhaltet die unipolare Teilung und anschließende Adhäsion der einzelnen Zellen, sowohl untereinander als auch an das Substrat (Gimeno *et al.*, 1992; Gimeno and Fink, 1992).

Welcher Bindungsmechanismus hinter den einzelnen Adhäsionsereignissen steht, konnte zumindest für die Zell-Zell Adhäsion anhand von Flo5 weitestgehend aufgeklärt werden. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Flokkulin Mannose-Zucker auf der Zelloberfläche benachbarter Zellen bindet, wodurch es als Lektin klassifiziert wurde (Taylor and Orton, 1978; Veelders *et al.*, 2010). Bei der durch Flo11 vermittelten Zell-Zell Adhäsion wird dagegen vermutet, dass es sich um homophile Wechselwirkungen handelt (Douglas *et al.*, 2007). Flo10 nimmt unter den Flokkulinen eine Sonderstellung ein, da es zwar in seiner primären Struktur weitaus größere Übereinstimmungen mit Flo1, Flo5 und Flo9, und weniger mit Flo11 aufweist, jedoch die gleichen dualen Adhäsionseigenschaften vermitteln kann wie Flo11. Insgesamt ist es allerdings schwierig die Funktion einzelner Flokkuline zu verallgemeinern, da beispielsweise bereits gezeigt werden konnte, dass Flo11 in verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen für die Ausprägung unterschiedlicher adhäsiver Phänotypen verantwortlich ist (Douglas *et al.*, 2007). Dadurch wird zusätzlich die Bedeutung des Stammhintergrundes bei der funktionalen Betrachtung von Flokkulinen hervorgehoben.

1.4.3 Regulation der Flokkulin-Expression

Die meisten der bisherigen Erkenntnisse zur Regulation der Flokkulin-Genexpression basieren auf der Erforschung des filamentösen, invasiven Wachstums von *S. cerevisiae*. Dementsprechend ist der Kenntnisstand zur Regulation von *FLO11*, und zu einem geringeren

Teil auch *FLO10*, deutlich höher als im Vergleich zu *FLO1*, *FLO5* und *FLO9*. Der Promotor von *FLO11* ist mit über 2.8 kb einer der größten in *S. cerevisiae* (Rupp *et al.*, 1999). Seine komplexe Regulation erfolgt hauptsächlich über den cAMP/PKA- und einen MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg, wobei aber noch weitere Regulationsmöglichkeiten bestehen. Die Aktivierung des cAMP/PKA-Signalweges erfolgt durch die Anwesenheit und die Phosphorylierung von Glukose (Rolland *et al.*, 2000). In dessen Verlauf spielt die indirekte Aktivierung der drei Proteinkinase A (PKA) Untereinheiten Tpk1-3 durch cAMP eine zentrale Rolle. Durch die Aktivität von Tpk1 erfolgt die Inaktivierung der Tyrosin-regulierten Kinase Yak1, was letztendlich zu einer negativen Regulation von *FLO11* durch den Repressor Sok2 führt (Malcher *et al.*, 2011). Gleichzeitig wird aber durch die ebenfalls aktive Tpk2-Kinase der Transkriptionsfaktor Flo8 aktiviert, was wiederum in einer positiven Regulation der *FLO11*-Expression resultiert. Tpk3 schließlich bewirkt vermutlich wie auch Tpk1 eine negative Regulation von *FLO11*, da *TPK3*-deletierte Stämme hyperfilamentöses Wachstum aufweisen, was in dem Fall auf die einseitige positive Regulation von *FLO11* durch Tpk2 zurückzuführen ist (Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 1999). Der Fus3/Kss1 MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg wird durch gleich mehrere Stimuli aktiviert, da er nicht nur für filamentöses Wachstum eine Rolle spielt, sondern auch bei der Pheromonantwort (Liu *et al.*, 1993). Die Signalweiterleitung erfolgt dabei durch jeweils eigene und gemeinsame Komponenten. Das gemeinsame Kernmodul in haploiden und diploiden *S. cerevisiae*-Zellen besteht aus den Kinasen Ste20, Ste11, Ste7, sowie dem Transkriptionsfaktor Ste12 (Liu *et al.*, 1993; Roberts and Fink, 1994). Die beiden Kinasen Fus3 und Kss1 sind dagegen spezifisch für jeweils einen Signalweg, wobei Fus3 an der Pheromonantwort beteiligt ist, während Kss1 an der Regulation des filamentösen Wachstums mitwirkt (Madhani *et al.*, 1997). Sowohl der cAMP/PKA- als auch der Fus3/Kss1 MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg sind aber nicht nur an der Regulation von *FLO11*, sondern auch von *FLO10* beteiligt (Halme *et al.*, 2004). Eine weitere Gemeinsamkeit besteht in der Transkriptionsinhibierung von *FLO11* und *FLO10* durch den Repressor Sfl1, welcher wiederum durch Tpk2 des cAMP/PKA-Signalweges negativ reguliert wird (Conlan and Tzamarias, 2001; Pan and Heitman, 2002; Halme *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur genetischen erfolgt die epigenetische Regulation von *FLO11* und *FLO10* auf unterschiedliche Weise, durch jeweils verschiedene Histondeacetylasen. *FLO11* wird dabei durch die Histondeacetylase Hda1 reguliert (Halme *et al.*, 2004). Deren Lokalisation am *FLO11* Promotor wird vermutlich durch den Co-Repressor Tup1 vermittelt (Wu *et al.*, 2001). Die Rekrutierung von Tup1 erfolgt wiederum durch Sfl1 (Conlan and Tzamarias, 2001). Auf

diese Weise besteht eine mögliche Verbindung zwischen dem cAMP/PKA-Signalweg und der epigenetisch negativen Regulation von *FLO11* durch Hda1. Die epigenetische Regulation von *FLO10* erfolgt ebenfalls in Abhängigkeit von Sfl1 durch die beiden Histondeacetylasen Hst1 und Hst2. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Sir3 und die Ku-Proteine, welche auch bei dem telomeren Positionseffekt („telomere position effect“, TPE) eine Rolle spielen, an der Regulation von *FLO10* beteiligt sind. Wichtige Unterschiede zum TPE bestehen allerdings darin, dass eines der vier Sir-Proteine, Sir2, nicht für die *FLO10*-Regulation benötigt wird, und dass die Regulation Promotorabhängig ist (Rine and Herskowitz, 1987; Mishra and Shore, 1999; Halme *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *FLO11* und *FLO10* ist über die Regulation von *FLO1*, *FLO5* und *FLO9* weniger bekannt. Für *FLO1* konnte u.a. gezeigt werden, dass auch hier die transkriptionelle Kontrolle durch Flo8 für dessen Expression entscheidend ist (Kobayashi *et al.*, 1996). Darüber hinaus wird der Co-Repressor Tup1 für die Repression von *FLO1* benötigt, allerdings unabhängig von Sfl1. Letztendlich ist bei der Betrachtung der *FLO*-Genregulation auch der Stammhintergrund von entscheidender Bedeutung, da bereits Unterschiede in der Regulation von invasivem Wachstum zwischen den beiden Laborstämmen Σ 1278b und S288c nachgewiesen werden konnten (Fichtner *et al.*, 2007).

1.4.4 Aufbau der Adhäsine in *S. cerevisiae*

Der Aufbau der Adhäsine in *S. cerevisiae* und verschiedenen weiteren *Saccharomyceten* setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen (Abb. 1.5). Jeder Domäne kommt dabei eine bestimmte Aufgabe zu. Am N-Terminus befindet sich zunächst eine Signalsequenz, bestehend aus ca. 17-30 Aminosäuren, mit hauptsächlich hydrophoben Eigenschaften. Diese markiert das Protein für den Import in das Endoplasmatische Retikulum und wird durch Signalpeptidasen vom Rest des Adhäsins abgespalten (Hoyer *et al.*, 1998). Auf die Signalsequenz folgt eine N-terminale Domäne, welche die Substratbindung vermittelt (Kobayashi *et al.*, 1998). Diese Domäne ist zumindest in *S. cerevisiae* reich an β -Faltblättern, was auf die besondere Stabilität dieses Strukturmotivs bei niedrigen, von *S. cerevisiae* bevorzugten pH-Werten zurückgehen könnte (Zhao *et al.*, 2001). Bezogen auf die Flokkuline in *S. cerevisiae* umfasst diese Bindedomäne ca. 180-270 Aminosäuren. Die nachfolgende zentrale Domäne besteht hauptsächlich aus sich wiederholenden Sequenzmotiven. Darüber hinaus enthält sie viele Serin und Threonin-Seitenketten, über welche die O-Glykosylierungen

dieser Domäne stattfinden. Es wird davon ausgegangen, dass die Glykosylierung dazu dient, um in Verbindung mit Ca^{2+} -Ionen der Domäne eine stabförmige Struktur zu verleihen (Jentoft, 1990). Diese wird wiederum benötigt, um die N-terminale Bindedomäne weit genug außerhalb der Zellwand in das umgebende Milieu präsentieren zu können, wo sie dann ihre jeweiligen adhäsiven Eigenschaften vermitteln kann (Loza *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2005). Eine weitere wichtige Funktion der zentralen Domäne beruht auf ihren repetitiven Sequenzmotiven. Diese sind in *FLO1*, *FLO5* und *FLO9* sehr ähnlich zueinander, wodurch es nicht nur durch intrachromosomale Rekombinationsereignisse, sondern auch durch interchromosomales inäquales Crossing-over oder Verrutschen der DNA-Polymerase während der Replikation zu einer Verlängerung, bzw. Verkürzung der Domäne kommen kann (Verstrepen *et al.*, 2004). Da eine längere zentrale Domäne oft gleichbedeutend mit einer stärkeren, und eine kürzere mit einer schwächeren Adhäsion ist, stellt dies neben der transkriptionellen Regulation eine weitere Möglichkeit für die Zelle dar ihre adhäsiven Eigenschaften variieren zu können (Bidard *et al.*, 1995; Verstrepen *et al.*, 2005). Die Variabilität der zentralen Domäne bezüglich ihrer Länge scheint jedoch nicht nur für die Interaktion zwischen der Bindedomäne und dem Liganden von Bedeutung zu sein, sondern auch für die Spezifität, da beispielsweise für verkürzte Flo1-Varianten ein erweitertes Ligandenspektrum nachgewiesen werden konnte (Liu *et al.*, 2007). Nach der Vorstellung von Liu *et al.* nimmt das verkürzte Protein dabei eine latente, hochaffine Konformation ein, welche in der Lage ist an mehr Liganden zu binden als Flo1. Für Flo11 konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Bildung eines Flors u.a. von der Anzahl der repetitiven Sequenzmotive abhängig ist (Fidalgo *et al.*, 2006).

Die C-terminale Domäne schließlich enthält eine GPI-Signalsequenz für einen GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker, welcher über eine Amidbindung an das Protein gebunden wird. Die Bindung des GPI-Ankers erfolgt dabei an die ω -Aminosäure, welche meistens durch eine Aminosäure mit nur sehr kurzer Seitenkette wie Glycin, Alanin, Serin, Asparagin, Asparaginsäure oder Cystein vertreten ist (Nuoffer *et al.*, 1993). Die N-terminalen Aminosäuren unmittelbar vor der ω -Bindestelle sind insbesondere für die spätere Lokalisation des Proteins in der Zellmembran oder der Zellwand entscheidend. Dabei konnte z. B. nachgewiesen werden, dass eine basische Aminosäure an der Position $\omega - 2$, sowie eine weitere im Bereich $\omega - 1$ bis $\omega - 6$, eine membranständige Lokalisation des Proteins zur Folge hat (Frieman and Cormack, 2003).

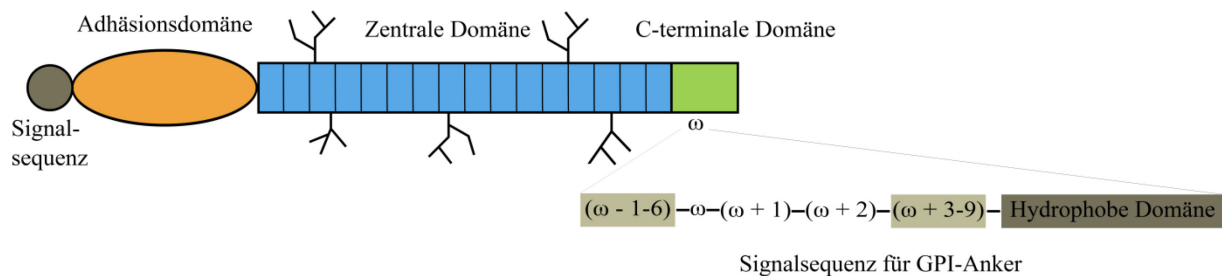


Abb. 1.5: Adhäsine in *S. cerevisiae* setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Die aminoterminal Signalsequenz wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch eine Signalpeptidase abgespalten. Die Ligandenbindung erfolgt durch die Adhäsionsdomäne welche mit Hilfe der hochglykosylierten, zentralen Domäne außerhalb der Zellwand präsentiert wird. Um das Adhäs in der Zellwand zu verankern, wird im ER die C-terminale Signalsequenz zwischen der ω und der $\omega + 1$ Position durch eine Transamidase gespalten und ein GPI-Anker mit der ω -Aminosäure verknüpft.

Im C-terminalen Bereich nach der ω -Aminosäure sind wiederum die beiden nachfolgenden Aminosäuren $\omega + 1$ und $\omega + 2$ für die Bindung des GPI-Ankers von Bedeutung. Diese bestehen, wie die ω -Bindestelle selbst, bevorzugt aus Aminosäuren mit nur sehr kurzen Seitenketten. Ein Vergleich dieses Bereichs zwischen verschiedenen GPI-Proteinen liefert jedoch Hinweise darauf, dass falls sich an einer der drei Positionen eine Aminosäure mit langer Seitenkette befindet, ein negativer GPI-Bindungseffekt durch die beiden anderen Aminosäuren kompensiert werden kann (Micanovic *et al.*, 1990; Nuoffer *et al.*, 1993). Die Aminosäuren an den Positionen $\omega + 3$ bis ca. $\omega + 9$ fungieren als Spacer-Region zwischen der ω -Aminosäure und dem Beginn einer C-terminalen, hydrophoben Domäne. Die Anwesenheit und Integrität dieser Domäne ist ebenfalls essentiell für die Bindung eines GPI-Ankers an das Protein (Berger *et al.*, 1988; Nuoffer *et al.*, 1991). Diese erfolgt mit Hilfe einer Transamidase, welche das Protein zwischen der ω und der $\omega + 1$ Position schneidet, und den GPI-Anker über eine Amidbindung an die ω -Aminosäure bindet (Gerber *et al.*, 1992).

1.4.5 Die Adhäsionsdomäne der PA14-artigen Flokkuline

Die Adhäsionsdomäne von Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 besteht jeweils aus einer PA14-Domäne, zusammen mit einer für jedes Flokkulin spezifischen Subdomäne. Die PA14-Domäne stellt ein weit verbreitetes, tertiäres Strukturmotiv dar, und ist neben den Adhäsinen in einer Vielzahl unterschiedlicher bakterieller und eukaryotischer Proteine wie Glykosidasen,

Glykosyltransferasen, Proteasen und bakteriellen Toxinen enthalten (Rigden *et al.*, 2004). Ursprünglich als Teil des protektiven Antigens (PA) des Anthrax-Toxins aus *Bacillus anthracis* identifiziert, erhielt es seinen Namen durch sein theoretisches Molekulargewicht von 14 kDa (Abb. 1.6a+b; Rigden *et al.*, 2004). Die PA14-Domäne setzt sich aus zwei antiparallelen β -Faltblättern bestehend aus fünf bzw. sechs einzelnen Strängen zusammen, welche insgesamt eine β -Sandwichstruktur bilden (Petosa *et al.*, 1997; Rigden *et al.*, 2004). Als Bestandteil einer Vielzahl von Proteinen, bisher sind 2372 PA14-Domänen in 2161 Proteinen bekannt (Quelle: Simple Modular Architecture Research Tool des EMBL-Heidelberg), konnten dieser Domäne bisher jedoch ausschließlich Carbohydrat-bindende und keine katalytischen Eigenschaften zugewiesen werden. Vielmehr wird die PA14-Domäne oftmals in Kombination mit weiteren Domänen innerhalb eines Proteins identifiziert, welche katalytische oder nicht-katalytische Eigenschaften besitzen (Rigden *et al.*, 2004).

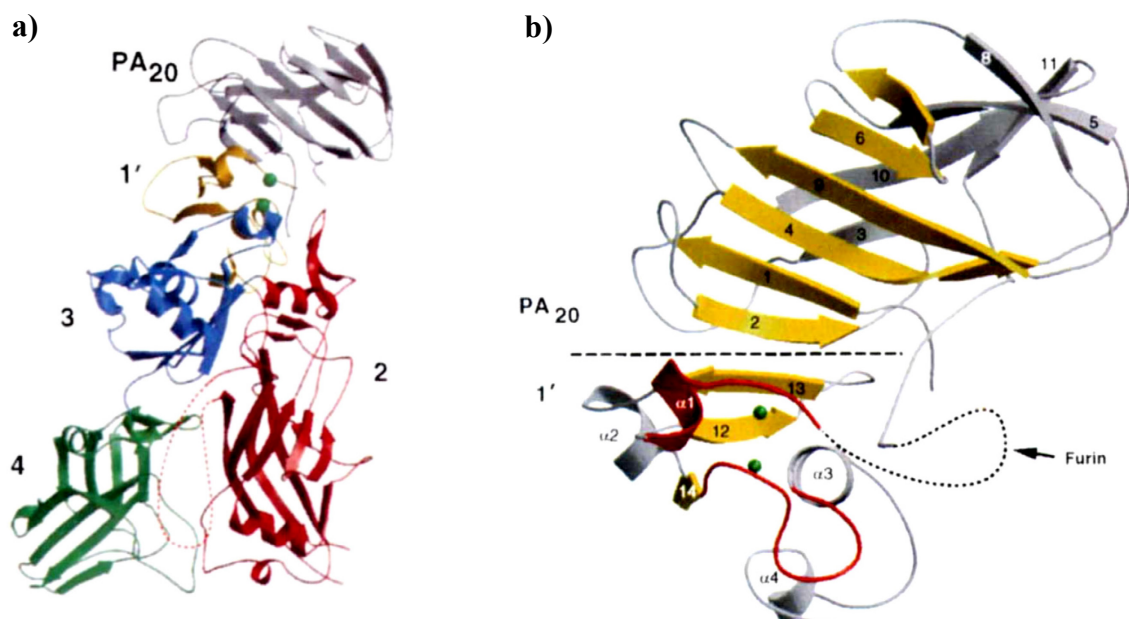


Abb. 1.6: Kristallstruktur des protektiven Antigens, welches Bestandteil des Anthrax-Toxins aus *Bacillus anthracis* ist. (a) Die PA83-Form des protektiven Antigens setzt sich aus insgesamt vier Domänen zusammen. (b) Dabei ist die PA14-Domäne Teil von PA20 in Domäne 1, welches im Laufe der Wirkung des Toxins vom Rest der ersten Domäne (1') durch eine Furin-Protease proteolytisch abgespalten wird. Dies ist anhand der geraden, gestrichelten Linie dargestellt. Darüber hinaus erfolgt in Domäne 1' die Bindung von zwei Calcium-Ionen, welche durch grüne Kugeln angedeutet sind (Aus Petosa *et al.*, 1997).

Bezogen auf die Flokkuline in *Saccharomyces* ist die PA14-Domäne innerhalb der Adhäsionsdomäne mit einer Subdomäne verbunden, welche der Domäne insgesamt ihre Spezifität in Hinsicht auf die Carbohydratbindung verleiht (Veelders *et al.*, 2010). Als Beispiel hierzu können die Adhäsionsdomänen von Flo5 aus *Saccharomyces cerevisiae* und

LgFlo1 aus *Saccharomyces pastorianus* dienen. Für beide Domänen konnte bereits die Struktur und die Art der Liganden aufgeklärt werden. Während Flo5A eine Subdomäne enthält und eine bevorzugte Mannose-Bindung aufweist, enthält die Adhäsionsdomäne von LgFlo1 anstatt einer Subdomäne eine kürzere, hoch flexible Schleife (Veelders *et al.*, 2010; Sim *et al.*, 2013). Als Liganden werden von LgFlo1A allerdings nicht nur Mannose, sondern auch Glukose gebunden, weshalb es zum Typ der NewFlo-Flokkulinen zählt (Stratford and Assinder, 1991; Sim *et al.*, 2013). Das unterschiedliche Ligandenspektrum wird dabei u.a. durch die Anwesenheit eines Glutamins an Position 98 von Flo5A bestimmt, welches innerhalb der Subdomäne liegt. Dieses ist direkt an der Bindung von Mannose beteiligt, indem die Seitenkette von Q98 über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der 2'Hydroxygruppe des Saccharids verbunden ist. Im Zuge der weiteren funktionalen Aufklärung der Adhäsionsdomäne von Flo5 konnte kristallographisch zwar auch die Bindung von Glukose beobachtet werden, diese führte jedoch zu einer Verschiebung von Q98. *In vivo* konnte die durch Flo5A vermittelte Flokkulation nur geringfügig durch hohe Glukosekonzentrationen inhibiert werden, was zusätzlich auf eine schwache, nicht-spezifische Bindung hinweist (Veelders *et al.*, 2010).

Vergleicht man die Proteinsequenzen der Flo-Adhäsionsdomänen aus den beiden *S. cerevisiae*-Laborstämmen Σ 1278b und S288c miteinander fällt zunächst auf, dass sich diese sowohl in der PA14-Domäne als auch in ihren jeweiligen Subdomänen voneinander unterscheiden (Abb. 1.7). Die Sequenzübereinstimmung zwischen Flo5A und den einzelnen Flo1 und Flo9 A-Domänen ist dabei deutlich höher als im Vergleich zu Flo10A (Flo1A_{Sigma1278b} 95 %, Flo1A_{S288c} 94 %, Flo9A_{Sigma1278b} 87 %, Flo9A_{S288c} 89 %, und Flo10A 71 %). Die höhere Abweichung von Flo10A zu den anderen PA14-artigen Adhäsionsdomänen ist insbesondere auf dessen längere und sequenziell sehr individuelle Subdomäne zurückzuführen (Abb. 1.7). Zusätzlich sind bei den in Abb. 1.7 gezeigten Flo-Adhäsionsdomänen nicht alle Aminosäure-Seitenketten welche an der Ligandenbindung beteiligt sind mit denen von Flo5A, wo sie zuerst identifiziert wurden, identisch (Abb. 1.7, Abb. 1.8, Veelders *et al.*, 2010). Insgesamt werfen die genannten Unterschiede die Frage nach den funktionalen Konsequenzen, bzw. Möglichkeiten für jede einzelne Flo-Adhäsionsdomäne auf. Zu den adhäsiven Eigenschaften der Flo-Adhäsine aus *Saccharomyces cerevisiae* gibt es bereits zahlreiche Veröffentlichungen (Bidard *et al.*, 1994; Govender *et al.*, 2008; Smukalla *et al.*, 2008; Van Mulders *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2000).

[illegible]

Abb. 1.7: Vergleich der FloA-Domänen auf Proteinebene. Es sind sowohl die Subdomäne eingezeichnet, als auch die an der Bindung des von Flo5A bevorzugten Liganden α -1,2-Mannobiose beteiligten Aminosäuren. Die Nummerierungen zu Beginn und am Ende der Sequenzen geben die Grenzen der Adhäsionsdomäne innerhalb des gesamten Flokkulin-Proteins an.

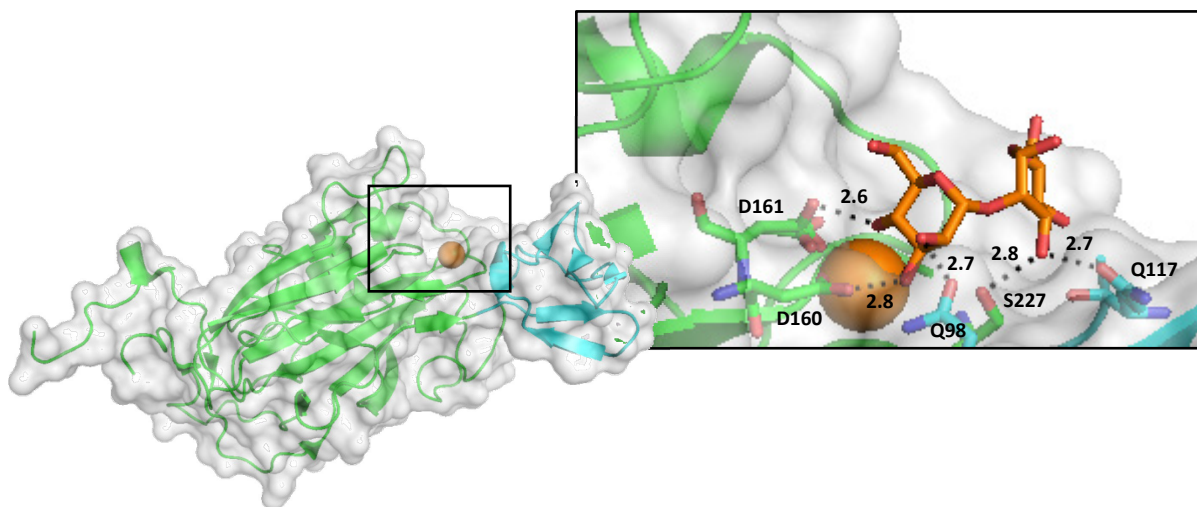


Abb. 1.8: Dreidimensionale Struktur der Flo5_{Σ1278b/Σ288c}-Adhäsionsdomäne. Die PA14-Domäne ist Grün, und die Flo5A-spezifische Subdomäne Türkis markiert. Das Ca²⁺-Ion innerhalb der primären Bindetasche ist als orangene Kugel dargestellt. In der Detailansicht ist die Bindung von α-1,2-Mannobiose durch verschiedene Aminosäure-Seitenketten mit den jeweiligen Abständen in Ångström zu sehen (PDB-ID 2XJS aus Veelders *et al.*, 2010).

Oft lag der Fokus in diesen Studien jedoch hauptsächlich auf bestimmten Flokkulinen mit unterschiedlichem Stammhintergrund. Zudem fand die funktionale Charakterisierung meist am Gesamt-Protein mit Hilfe von Überexpression auf chromosomaler Ebene statt. Auf diese

Weise konnten beispielsweise die Flo-Proteine Flo1, Flo5, Flo9, Flo10, und Flo11 im Laborstamm S288c im Einzelnen auf ihre adhäsiven Eigenschaften hin getestet werden (Van Mulders *et al.*, 2009). Dabei wiesen Flo1, Flo5, und Flo9 bei diesem Stamm die stärkste Flokkulation auf, während Flo10 nur schwache, und Flo11 makroskopisch keine Zell-Zell Adhäsion vermitteln konnte. Die durch Flo1 vermittelte Zell-Zell Adhäsion konnte ausschließlich durch Mannose inhibiert werden, während die durch Flo5 vermittelte Flokkulation darüber hinaus schwach durch Glukose aufgehoben werden konnte. Flo10 wies für beide Saccharide die stärkste Sensitivität auf. Hinsichtlich der Zell-Oberflächen Adhäsion an Agar konnten nach 6 Tagen Inkubationsdauer lediglich Flo10 und Flo11 Adhäsion vermitteln. Die gleichen Ergebnisse wie im Stamm S288c wurden auch für die Flo1, Flo10 und Flo11 Flokkuline aus Σ 1278b erzielt, wobei hier auch für Flo11 eine schwache Zell-Zell Adhäsion nachgewiesen werden konnte (Guo *et al.*, 2000). Im Zuge der Identifizierung und Charakterisierung der Flo-Adhäsine wurde schließlich auch deren N-terminaler Bereich als Ligand-Bindestelle definiert (Kobayashi *et al.*, 1998; Goossens *et al.*, 2011). Die genaue Art der Ligandenbindung durch die PA14-artigen Flokkuline wurde anhand von Flo5A ermittelt (Abb. 1.8; Veelders *et al.*, 2010). Ein direkter funktionaler Vergleich der aus dem Gesamt-Protein isolierten Flo-Adhäsionsdomänen aus einem oder mehreren *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen hatte bisher jedoch noch nicht stattgefunden.

1.5 Weitere Hefe-Adhäsine

Adhäsine, deren Adhäsionsdomäne eine PA14-Domäne enthalten, sind nicht nur in *Saccharomyces* zu finden sondern beispielsweise auch in der humanpathogenen Hefe *Candida glabrata*. Ähnlich wie bei LgFlo1 aus *S. pastorianus* enthalten die Epa („epithelial adhesin“)-Adhäsine anstatt einer Subdomäne eine Schleife, welche im Vergleich zu LgFlo1 jedoch länger ist und durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird (Abb. 1.9a; Veelders *et al.*, 2010; Ielasi *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2013). Wie der Name bereits andeutet erfolgt mit Hilfe der Epa-Adhäsine die Bindung von *Candida glabrata* an u.a. humane Epithelzellen, was *Candida glabrata* nach *Candida albicans* zum zweithäufigsten Erreger einer so genannten Kandidose macht. Bei *Candida glabrata* sind dabei insbesondere die Schleimhäute, sowie die Organe von immunsupprimierten Individuen betroffen (Fidel *et al.*, 1999). Das Genom von *Candida glabrata* enthält bis zu 23 EPA-verwandte Sequenzen, von denen einige als vollständige GPI-verankerte Zellwandproteine identifiziert und funktional untersucht worden

sind (Cormack *et al.*, 1999; Castaño *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2005; Doktorarbeit Rike Diderrich, 2014). Der Aufbau der Epa-Adhäsine entspricht dem der Flokkulin-Domänenstruktur aus *S. cerevisiae* (Abb. 1.5; Cormack *et al.*, 1999; De Las Peñas *et al.*, 2003). Darüber hinaus erfolgt, wie auch bei den Flo-Adhäsinen, die Bindung der Liganden in Abhängigkeit von Calcium-Ionen mit Hilfe der N-terminalen Adhäsionsdomäne (Cormack *et al.*, 1999, Frieman *et al.*, 2002; Ielasi *et al.*, 2012). Als Liganden werden, entsprechend ihrer Funktion, jedoch unterschiedliche Saccharide im Vergleich zu den Flo-Adhäsinen gebunden. Bei Epa1 ist dies eine endständige Galaktose, welche bevorzugt über eine β -1,3 oder β -1,4 glykosidische Verknüpfung mit dem Rest des jeweiligen Oligosaccharids verbunden ist. Epa7 weist ein vergleichbares Bindungsverhalten zu Epa1 auf, während Epa6 keine Präferenz gegenüber endständig α - oder β -verknüpfter Galaktose aufweist (Zupancic *et al.*, 2008; Maestre-Reyna *et al.*, 2012).

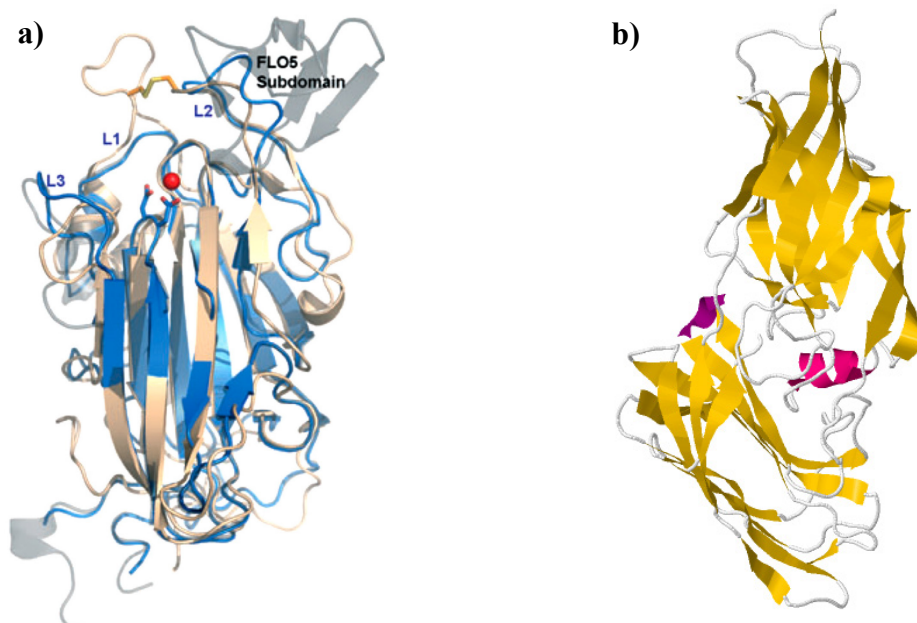


Abb. 1.9: Dreidimensionale Struktur verschiedener Adhäsionsdomänen. (a) Strukturvergleich der Adhäsionsdomänen von Epa1, LgFlo1 und Flo5. Während die Adhäsionsdomäne von Flo5 (Grau) neben der PA14-Domäne eine Flo5-spezifische Subdomäne enthält, ist in LgFlo1 (Blau) und Epa1 (Beige) stattdessen eine Schleife vorhanden. Die ausgedehntere Schleife von Epa1 wird dabei durch eine Disulfidbrücke stabilisiert (orange und gelbe Stäbe) (Aus Sim *et al.*, 2013). (b) Struktur der N-terminalen Domäne von Als9-2. Die Adhäsionsdomäne des 2 Allels von Als9 aus *Candida albicans* setzt sich aus zwei Domänen zusammen, welche hauptsächlich aus β -Faltblättern bestehen und eine IgG-ähnliche Konformation einnehmen. Zusammen bilden diese eine Struktur, wie sie auch in bakteriellen Adhäsinen gefunden wurde (Zhao *et al.*, 2003; PDB-ID 2Y7L aus Salgado *et al.*, 2011).

Die Adhäsine von *Candida albicans*, dem häufigsten Erreger einer Candidose, unterscheiden sich sowohl strukturell als auch funktionell von den Flo- und Epa-Adhäsinen. Obwohl auch bei diesen Adhäsinen eine Domänenstruktur mit einer zentralen Domäne, bestehend aus repetitiven Sequenzmotiven, zu finden ist konnte nachgewiesen werden, dass der N- und C-terminale Bereich große Ähnlichkeiten mit dem α -Agglutinin aus *S. cerevisiae* aufweist (Abschnitt 1.4.1), wodurch sie fortan als Agglutinin-ähnliche Sequenzen („agglutinin-like sequences“, *ALS*) bezeichnet wurden (Hoyer *et al.*, 1995). Insgesamt wurden bisher 8 *ALS*-Gene identifiziert (*ALS1-7* und *ALS9*; Hoyer *et al.*, 1995; Hoyer *et al.*, 1998a+b; Hoyer and Hecht, 2000; Hoyer and Hecht, 2001; Hoyer, 2001; Zhao *et al.*, 2003). Ihre Verbreitung ist jedoch nicht nur auf *C. albicans* beschränkt. Ebenso konnten Als-Adhäsine in *C. dubliniensis* und *C. tropicalis* nachgewiesen werden, welche sich jedoch teilweise in ihrer Anzahl, ihrer Sequenz, und letztendlich auch in ihrer Expression von *C. albicans* unterscheiden (Hoyer *et al.*, 2001). Auch bei den Als-Adhäsinen ist die N-terminale Domäne verantwortlich für die Adhäsion (Loza *et al.*, 2004). Diese setzt sich aus zwei IgG-ähnlichen Immunglobulindomänen zusammen (DEvariant-IgG; Deivanayagam *et al.*, 2002), welche hauptsächlich aus antiparallelen β -Faltblättern bestehen (Abb. 1.9b; Salgado *et al.*, 2011). Interessanterweise bilden beide Domänen zusammen eine Struktur, wie sie zuvor auch in bakteriellen Adhäsinen wie ClfA („clumping factor A“) aus *Staphylococcus aureus* und SdrG aus *Staphylococcus epidermis* gefunden wurde (Deivanayagam *et al.*, 2002; Ponnuraj *et al.*, 2003). Anstelle von Sacchariden, wie bei den Flo- und Epa-Adhäsinen, werden von den Als-Adhäsinen Peptide gebunden, wobei bestimmte Peptidsequenzen erkannt und gebunden werden. Da diese Sequenzen jedoch in unterschiedlichen Aminosäure-Kombinationen vorkommen können und sich darüber hinaus die Spezifität einzelner Als-Adhäsine bezüglich ihrer Liganden unterscheidet, stellt die Als-Adhäsinfamilie für den Organismus einen effektiven Mechanismus dar um an eine große Anzahl von Liganden binden zu können (Klotz *et al.*, 2004).

1.6 Fragestellung

Nachdem für die Flo1, Flo5, und LgFlo1-Adhäsionsdomänen in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass diese ausreichend sind um die adhäsiven Eigenschaften der einzelnen Flokkuline zu vermitteln, sollte in dieser Arbeit erstmals ein direkter Vergleich der PA14-artigen Flo1, Flo5, Flo9, und Flo10-Adhäsionsdomänen aus *S. cerevisiae* stattfinden. Um die Frage nach Gemeinsamkeiten, bzw. Unterschieden im Adhäsionsverhalten der verschiedenen FloA-Domänen beantworten zu können, sollte als Träger ein einheitlicher, auf Flo11-basierender Vektor verwendet und verschiedene molekularbiologische und biochemische Versuche durchgeführt werden. Danach sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern die Subdomäne innerhalb der Adhäsionsdomäne zu den adhäsiven Eigenschaften der FloA-Domäne beiträgt. Da Flo10 eine zu Flo1, Flo5, und Flo9 außergewöhnliche Subdomäne enthält, sollte neben der funktionalen Charakterisierung auch die Struktur der Flo10-Adhäsionsdomäne aufgeklärt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die gewonnenen Erkenntnisse auf *S. cerevisiae*-Stämme außerhalb des Labors übertragen werden können. Um zunächst die Variabilität der Flo1, Flo5, Flo9, und Flo10 A-Domänen ermitteln zu können, sollten diese aus verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen, welche industriell genutzt oder aus verschiedenen anderen Substraten stammten, isoliert werden. Neben der sequenziellen Variabilität sollte mit Hilfe der bereits im ersten Teil angewandten molekularbiologischen Methoden auch die funktionale Variabilität zwischen ausgewählten FloA-Domänen gemessen werden.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der PA14-artigen FloA-Domänen

2.1.1 Expression der verschiedenen FLOA-Domänen

Um die Funktionalität der verschiedenen FloA-Domänen bezüglich der Zell-Zell und Agar-Adhäsion zu ermitteln, wurden entsprechende codierende Bereiche in ein spezielles Expressionsplasmid inseriert (Abb. 2.1). Dieses besteht aus einem *CEN*-Vektor mit niedriger Kopienzahl, welcher eine *HA*-markierte Version des *FLO11*-Genes ohne Adhäsionsdomäne (A-Domäne) aus dem Laborstamm $\Sigma 1278b$ enthält. Die Kontrolle der Expression erfolgt über den konstitutiven Promotor *PGK1*. Die Signalsequenz (SS) für dieses Lektin stammt ebenfalls aus *FLO11*. Danach befindet sich eine kurze Spacer-Sequenz zwischen der Signalsequenz und dem dreifachen Hämagglutinin-Tag, über den der immunologische Nachweis der Flokkuline auf der Zelloberfläche mit Hilfe von Immunfluoreszenz erfolgen kann. Die zentrale B-Domäne, die C-Domäne und der Terminator stammen ebenfalls aus dem *FLO11*-Gen.



Abb. 2.1: Aufbau des Expressionsplasmids zur funktionalen Charakterisierung von FloA-Domänen. Die Kontrolle der Expression erfolgt mit Hilfe des konstitutiven *PGK1*-Promotors. Der Nachweis der Flokkuline an der Zelloberfläche ist über ein dreifaches, N-terminales Hämagglutinin-Tag möglich. Für die Insertion der jeweiligen A-Domänen in den Vektor werden die beiden Restriktionsschnittstellen *SacI/SacII* verwendet. Als B- und C-Domäne dienen die entsprechenden Sequenzen aus dem *FLO11*-Gen.

Die zu testenden *FLOA*-Domänen, welche mit Hilfe der beiden Restriktionsschnittstellen *SacI/SacII* in das Plasmid inseriert wurden, sind in Tab 2.1 zu sehen. Dabei handelt es sich um die PA14-artigen *FLO*-Adhäsionsdomänen aus den beiden Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c: *FLO1A* $_{\Sigma 1278b}$, *FLO1A* $_{S288c}$, *FLO5A* $_{\Sigma 1278b/S288c}$, *FLO9A* $_{\Sigma 1278b}$, *FLO9A* $_{S288c}$, und *FLO10A* $_{\Sigma 1278b/S288c}$. Ein Vergleich der Proteinsequenzen zwischen den einzelnen FloA-Domänen ist in Abb. 1.7 zu sehen. Die Sequenzen von Flo5A und Flo10A sind in beiden Stämmen identisch. Dagegen unterscheiden sich die Proteinsequenzen der Flo1A-Domänen stellenweise innerhalb der PA14-Domäne, nicht aber in der Subdomäne. Darüber hinaus sind

Tab. 2.1: Übersicht über die Konstrukte, welche für die *in vivo* Tests mit *FLOA*-Domänen aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c verwendet wurden. Während sowohl die Nukleotid als auch die Proteinsequenzen der *FLO5* und *FLO10* A-Domänen aus beiden Laborstämmen jeweils identisch sind, unterscheiden sich die Gen- und Proteinsequenzen von *FLO1* und *FLO9* aus den jeweiligen Stämmen voneinander. Die Plasmide B2445, BHUM2157 und BHUM2158 dienten als Positiv-, bzw. Negativkontrollen.

Konstrukt	Bezeichnung in der Stammsammlung
Leervektor	B2445
<i>FLOA</i> - Δ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2157
<i>FLO11A</i> $_{\Sigma 1278b}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2158
<i>FLO1A</i> $_{\Sigma 1278b}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2298
<i>FLO1A</i> $_{S288c}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2856
<i>FLO5A</i> $_{\Sigma 1278b/S288c}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2295
<i>FLO9A</i> $_{\Sigma 1278b}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2299
<i>FLO9A</i> $_{S288c}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2716
<i>FLO10A</i> $_{\Sigma 1278b/S288c}$ - <i>FLO11BC</i> $_{\Sigma 1278b}$	BHUM2300

alle der an der Bindung des bevorzugten Liganden α -1,2-Mannobiose beteiligten Aminosäuren wie in Flo5A vorhanden. Die Flo9A-Domänen unterscheiden sich auf Proteinebene dagegen sowohl in ihrer Subdomäne als auch in ihrer PA14-Domäne. Zudem weichen die Aminosäuren an den Positionen 117 und 227, welche an der Bindung des zweiten Mannose-Restes von α -1,2-Mannobiose beteiligt sind, sowohl untereinander als auch von Flo5A größtenteils ab. Während Flo5A an den entsprechenden Positionen ein Glutamin und ein Serin enthält, befindet sich bei Flo9A $_{\Sigma 1278b}$ an Position 117 ein Lysin und an Position 227 ebenfalls ein Serin. Bei Flo9A $_{S288c}$ sind dies hingegen ein Prolin bzw. ein Alanin. Flo10A unterscheidet sich von den Flo1, Flo5, und Flo9A-Domänen insbesondere durch seine fast doppelt so lange und sequenziell stark abweichende Subdomäne. Allerdings sind in Flo10A nahezu alle der für die Bindung von α -1-2-Mannobiose essentiellen Aminosäuren die gleichen wie in Flo5A, mit Ausnahme von Q98. Stattdessen befindet sich in Flo10A an Position 98 ein Aspartat. Als Negativkontrollen für die *in vivo* Tests wurden die Plasmide B2445 ohne *FLO*-Gen, und BHUM2157 mit dem *FLO11*-Gen ohne *FLOA*-Domäne wie es in Abb. 2.1 zu sehen ist verwendet. Durch letzteres sollte nachweislich ausgeschlossen werden, dass die Flo11 B-Domäne funktionsvermittelnd ist und die Ergebnisse somit alleine auf die Funktion der FloA-Domänen zurückzuführen sind. Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Plasmid mit dem gesamten HA-markierten *FLO11*-Gen aus dem *S. cerevisiae* Stamm $\Sigma 1278b$ verwendet. Da für die Flo11 $_{\Sigma 1278b}$ A-Domäne bereits bekannt war, dass sie keine Zell-Zell Adhäsion dafür aber

Adhäsion an Agar vermitteln kann, diente sie für den Flokkulations- und Agar-Adhäsionstest als Negativ-, bzw. Positivkontrolle.

In einem nächsten Schritt wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten Expressionsplasmide in den nicht-adhäsiven *S. cerevisiae*-Stamm YHUM0924 (Tab. 4.12) transformiert und die Menge der hergestellten Flokkuline mittels des HA-Tags Fluoreszenzmikroskopisch beurteilt (Abschnitt 5.6.1, Abb. 2.2).

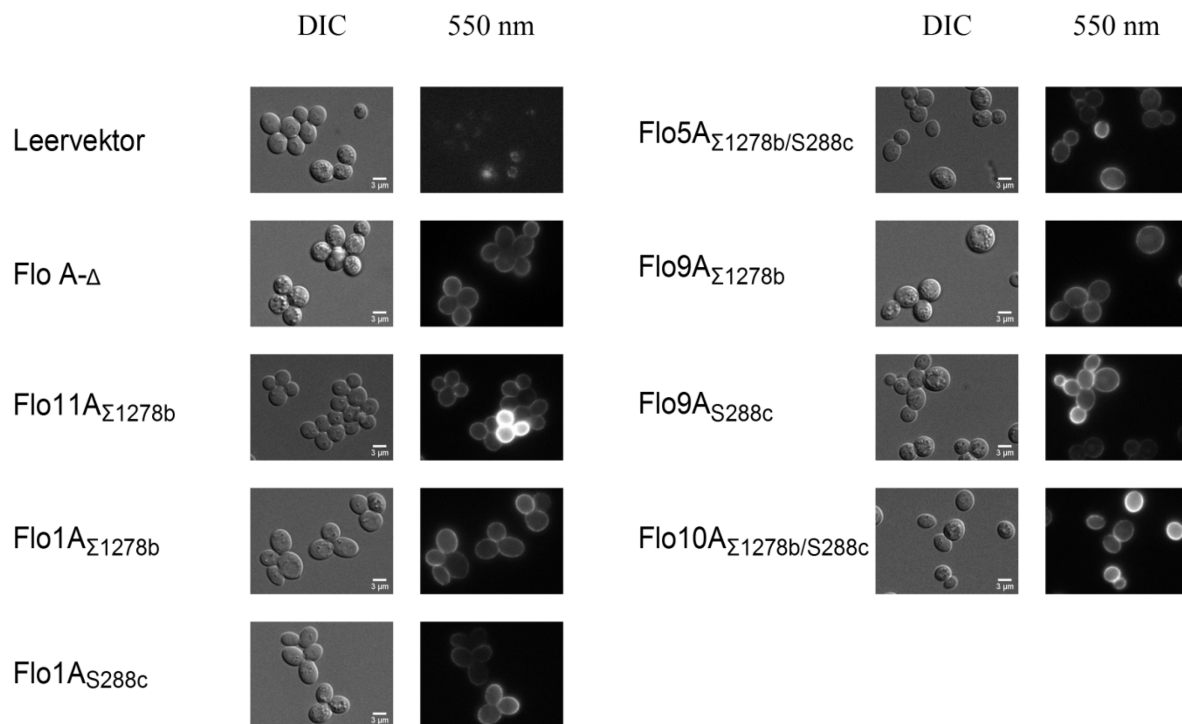


Abb. 2.2: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Flokkulinkonstrukte auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae*. Für jedes Konstrukt sind einige Zellen bei Durchlicht (DIC) und bei 550 nm dargestellt. Zellen mit dem Leervektor wiesen wie erwartet keine Fluoreszenz auf, da in diesem kein HA-Tag vorhanden war. Der Größenstandard gibt 3 µm an.

Dabei wies der Stamm, welcher das Plasmid B2445 ohne *FLO*-Gen enthielt, wie erwartet keine Fluoreszenz aufgrund des fehlenden HA-Tags auf. Für alle anderen Stämme, welche das HA-Tag enthielten, konnte Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese war in allen Stämmen etwa gleich stark, wobei neben der durchschnittlich beobachteten Fluoreszenzstärke teilweise auch Zellen mit einer höheren Fluoreszenz in jedem Stamm vorhanden waren. Die Verteilung zwischen stark und schwach fluoreszierenden Zellen verhielt sich jedoch in allen Stämmen in etwa gleich.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der rekombinanten Flokkuline in der Zellwand von *S. cerevisiae* konnten die Stämme für die nachfolgenden *in vivo* Adhäsionstests verwendet werden (Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3).

2.1.2 Vermittlung von Zell-Zell Adhäsion durch verschiedene FloA-Domänen

Für die Messung der Zell-Zell Adhäsion in Form von Flokkulation wurde ein Flokkulationstest durchgeführt. Als Grundlage für die Berechnung der Flokkulationsrate in Prozent diente dabei die Differenz zwischen der optischen Dichte einer Kultur zu Beginn einer Messung und nach der Zugabe von verschiedenen Testlösungen. Während der Durchführung des Tests erfolgte zunächst die Zugabe von EDTA zu den Zellen, bei der das Ca^{2+} -Ion innerhalb der primären Bindetasche komplexiert und die FloA-Domänen somit zunächst inaktiviert wurden. Anschließend wurden die FloA-Domänen mit Hilfe der Testlösungen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, welche je nach Reaktion der Adhäsionsdomänen Rückschlüsse auf deren jeweilige adhäsiven Eigenschaften zuließen. Die Zugabe von H_2O und die anschließend beobachtete Flokkulationsstärke sollte zunächst Aufschluss über die Effizienz der Ca^{2+} -Komplexierung durch EDTA geben. Durch die Zugabe von 10 mM CaCl_2 sollten hingegen die adhäsiven Eigenschaften der FloA-Domänen wieder hergestellt, und die jeweils maximal mögliche Flokkulationsstärke gemessen werden. Die Testlösungen welche 10 mM CaCl_2 in Verbindung mit steigenden Mannosekonzentrationen enthielten sollten dagegen nicht nur die FloA-Domänen reaktivieren, sondern dienten auch der Messung des kompetitiven Einflusses von freier Mannose auf die Flokkulation. Dadurch wurde zum einen nachgewiesen, dass Mannose von allen getesteten PA14-Domänen als Ligand gebunden wird, und der Mechanismus, welcher der Flokkulation zugrundeliegt, sehr wahrscheinlich der gleiche ist wie für Flo5A, nämlich die Bindung von endständiger α -1,2-Mannobiose in der Zellwand von benachbarten Zellen. Zum anderen konnten durch die Messungen mit freier Mannose Rückschlüsse auf die Bindungsstärke zwischen Ligand und Adhäsion getroffen werden, unabhängig von weiteren nachfolgenden Sacchariden wie sie in der Zellwand von *S. cerevisiae* vorhanden sind und welche aufgrund weiterer Bindemöglichkeiten ebenfalls zur Flokkulationsstärke beitragen könnten. Die Messwerte in Abb. 2.3 stellen den Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD, „standard deviation“) von mindestens sechs einzelnen gemessenen Werten für jeden Stamm dar. Als Kontrollen dienten für diesen Test *S. cerevisiae*-Stämme, welche jeweils das

Plasmid B2445 ohne *FLO11*-Gen (Leervektor), BHUM2157 ohne *FLOA*-Domäne (FloA- Δ), und BHUM2158 mit dem gesamten *FLO11* $_{\Sigma 1278b}$ -Gen (Flo11A $_{\Sigma}$) enthielten (Tab. 2.1).

Während des Flokkulationstests wies der Stamm welcher den Leervektor ohne *FLO*-Gen enthielt wie erwartet keine Adhäsion auf. Die beiden Stämme, welche keine FloA-Domäne oder Flo11A $_{\Sigma}$ in ihrer Zellwand enthielten, erreichten eine Flokkulationsrate von etwa 17 %, was auf die Aktivität der Flo11B-Domäne zurückzuführen ist und für diesen Test als Hintergrundaktivität gewertet wurde. Von den PA14-artigen FloA-Domänen erwies sich Flo5A, dessen Proteinsequenz in den beiden Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c identisch ist, mit einer maximal möglichen Flokkulationsrate von 88 % als die FloA-Domäne welche am stärksten Flokkulation vermitteln kann. Diese Flokkulationsrate stimmt mit der von Veelders *et al.* (2010) überein, wobei in dieser Veröffentlichung die Expression durch den *FLO11*-Promotor reguliert wurde und nicht, wie in dieser Arbeit, durch den konstitutiven Promotor von *PGK1*. Flo1A $_{S288c}$ und Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ wiesen ebenfalls eine starke Zell-Zell Adhäsion auf,

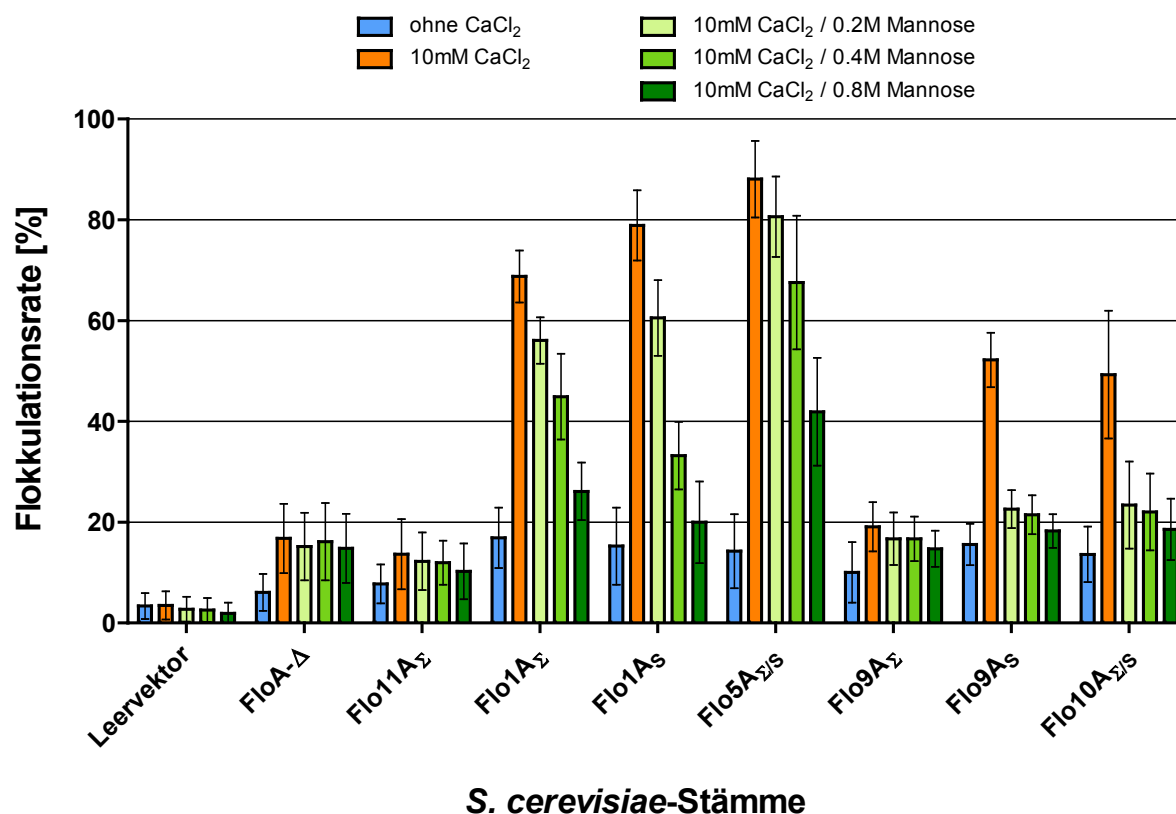


Abb. 2.3: Vermittlung der Flokkulation durch verschiedene FloA-Domänen. Es sind jeweils die Flokkulationsraten der FloA-Domänen aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c dargestellt. Neben der Messung der potentiell möglichen Flokkulationsrate wurde darüber hinaus der inhibitorische Einfluss von freier Mannose auf die Zell-Zell Adhäsion durch Zugabe von verschiedenen Mannosekonzentrationen bestimmt.

mit Flokkulationsraten von 79 % bzw. 69 %. Dies überraschte insofern nicht, als dass beide Flo1A-Domänen eine hohe Sequenzübereinstimmung auf Proteinebene mit Flo5A aufweisen, was auch die für die Ligandenbindung benötigten Aminosäuren mit einbezieht.

Von den beiden Flo9A-Domänen konnte Flo9A_{Σ1278b} überraschenderweise keine Zell-Zell Adhäsion vermitteln, obwohl bei der Ligandenbindung im Vergleich zu Flo5A lediglich eine andere Aminosäure an Position 117 vorhanden ist. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich Flo9A_{S288c} an den Positionen 117 und 227 von Flo5A, erreicht aber trotzdem eine Flokkulationsrate von 52 %. Für Flo10A, bei dem zwar alle an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren bis auf Q98 mit denen von Flo5A identisch sind, es jedoch eine zu den anderen PA14-artigen Adhäsionsdomänen stark abweichende Subdomäne enthält, konnte eine maximale Flokkulationsrate von 49 % gemessen werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse der jeweils erreichten Flokkulationsraten darauf hin, dass die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren zumindest teilweise variabel sind im Vergleich zu Flo5A. Doch selbst wenn die entsprechenden Aminosäuren an den Positionen 98, 117 und 227 identisch zu Flo5A sind, können sequenzielle Unterschiede in anderen Bereichen der A-Domäne zu funktionellen Unterschieden führen.

Durch die Zugabe von steigenden Mannosekonzentrationen konnte in diesem Test erstmals deren inhibitorischer Einfluss auf die Flokkulation zwischen den einzelnen FloA-Domänen direkt miteinander verglichen werden. Dabei erwiesen sich Flo5A, Flo1A_{S288c}, und Flo1A_{Σ1278b}, welche ohne die Zugabe von Mannose jeweils hohe maximale Flokkulationsraten erreichten, als unempfindlicher gegenüber freier Mannose als Flo9A_{S288c} und Flo10A, welche lediglich eine schwache Zell-Zell Adhäsion vermitteln können (Abb. 2.3). Während die Flokkulation von Flo9A_{S288c} und Flo10A bereits durch 0,2 M Mannose nahezu vollständig inhibiert wurde, war bei Flo5A, Flo1A_{S288c}, und Flo1A_{Σ1278b} selbst nach Zugabe von 0,8 M Mannose noch Zell-Zell Adhäsion messbar. Darüber hinaus war der Verlauf der Inhibition bei den beiden Flo1A-Domänen und Flo5A miteinander vergleichbar, was zumindest teilweise erwartet wurde aufgrund verschiedener *in vitro* Affinitätsmessungen mit FloA-Domänen, welche von Goossens *et al.* (2011), von Veelders *et al.* (2010) und in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Bei den Messungen von Goossens *et al.* erreichte die Dissoziationskonstante (K_D) von Flo1A_{S288c} gegenüber Mannose einen Wert von 37 mM, während diese für Flo5A laut Veelders *et al.* 29 mM, und nach Messungen im Zuge dieser Arbeit 45 mM beträgt. Demnach ist die Affinität der beiden FloA-Domänen gegenüber Mannose miteinander vergleichbar. Im Gegensatz dazu betrug der K_D -Wert von Flo1A_{S288c}

gegenüber α -1,2-Mannobiose 8,5 mM (Goossens *et al.*, 2011), und für Flo5A 3,5 mM (Veelders *et al.*, 2010), bzw. 3,7 mM in dieser Arbeit. Da die Flokkulationsrate von Flo1A_{S288c} gegenüber der von Flo5A aber nur etwas schwächer ist (79 %, bzw. 88 %, Abb. 2.3) lässt dies darauf schließen, dass wie bereits erwähnt auch die Interaktion weiterer nachfolgender Saccharide mit der Adhäsionsdomäne Einfluss auf die letztendliche Adhäsionsstärke nimmt. Dafür spricht auch, dass der K_D -Wert von Flo10A gegenüber α -1,2-Mannobiose laut eigenen Messungen 7 mM beträgt, während dessen Flokkulationsrate mit 49 % aber deutlich niedriger ist als die von Flo1A_{S288c}.

2.1.3 Messung der Agar-Adhäsion verschiedener FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c

Zu den adhäsiven Eigenschaften verschiedener Flo-Proteine an nicht-zelluläre Oberflächen, darunter auch an Agar, wurden bereits verschiedene Arbeiten durchgeführt. Diese fanden sowohl in *S. cerevisiae*-Stämmen mit dem Stammhintergrund Σ 1278b als auch S288c statt, jedoch auf genomischer Ebene. Für die Flo-Proteine Flo10 und Flo11 aus *S. cerevisiae* Σ 1278b konnte dabei gezeigt werden, dass diese Adhäsion an Agar vermitteln können. Im Gegensatz dazu wies Flo1 in demselben Stammhintergrund nach 5 Tagen Inkubation auf YEPD Agar-Medium keine Adhäsion auf (Guo *et al.*, 2000). Die Expression der einzelnen *FLO*-Gene erfolgte dabei mit Hilfe des *GALI*-Promotors in haploiden Stämmen. In der Arbeit von Fichtner *et al.* (2007) konnte dagegen mit Hilfe von haploiden *S. cerevisiae* S288c-Stämmen gezeigt werden, dass die Agar-Adhäsion bei diesem Stammhintergrund auf Flo1 zurückzuführen ist, während für das Pseudohyphenwachstum von diploiden Stämmen, wie auch im Stammhintergrund Σ 1278b, Flo11 benötigt wird. Die Genexpression erfolgte hierbei durch die jeweils eigenen *FLO*-Promotoren, indem eine funktionale Version des Transkriptionsfaktors *FLO8* in die S288c-Stämme eingebracht wurde. Die Adhäsion an Agar wurde nach einem Tag Inkubation auf SC-Medium analysiert.

Um das Adhäsionsvermögen der einzelnen FloA-Domänen aus den *S. cerevisiae* Stammhintergründen Σ 1278b und S288c an eine zellfremde Oberfläche, in diesem Fall an Agar, bestimmen zu können wurde ebenfalls ein Agar-Adhäsionstest durchgeführt. Dazu wurden die Stämme welche die entsprechenden *FLO*-Genkonstrukte enthielten (Tab. 2.1) großflächig auf YEPD Agar-Medium ausgestrichen und zunächst für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Platten für weitere 3-7 Tage bei RT inkubiert, um einerseits ein

Austrocknen der Platten durch die Absenkung der Temperatur zu verhindern. Zusätzlich konnten dadurch sowohl das Zellwachstum als auch die Induktion der *FLO*-Genexpression durch den *PGK1*-Promotor so lange stattfinden, bis die im Medium vorhandene Glukose aufgebraucht war. Nach der Inkubation wurde das Gesamtwachstum der Stämme zunächst fotografisch dokumentiert, bevor die Platten mit destilliertem Wasser unter einem Wasserstrahl gewaschen wurden. Anschließend wurden die Platten an der Luft getrocknet und erneut fotografiert. Bei diesem Test diente die Flo11 $_{\Sigma 1278b}$ A-Domäne als Positivkontrolle, während der Leervektor und das *FLO11*-Konstrukt ohne A-Domäne (FloA- Δ) wie schon beim Flokkulationstest als Negativkontrollen verwendet wurden. Basierend auf dem Ergebnis des Waschttests konnte nachgewiesen werden, dass alle getesteten FloA-Domänen, bis auf Flo5A, Adhäsion an Agar vermitteln können (Abb. 2.4). Es ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede. Während Flo10A und Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ bereits nach insgesamt 6 Tagen Inkubation Adhäsion an Agar aufwiesen, konnte bei Flo1A $_{S288c}$, Flo9A $_{\Sigma 1278b}$ und Flo9A $_{S288c}$ erst nach 10 Tagen Inkubationszeit leichte Adhäsion an Agar beobachtet werden. Während dieser Zeit blieb die Adhäsionsstärke von Flo10A und Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ allerdings unverändert.

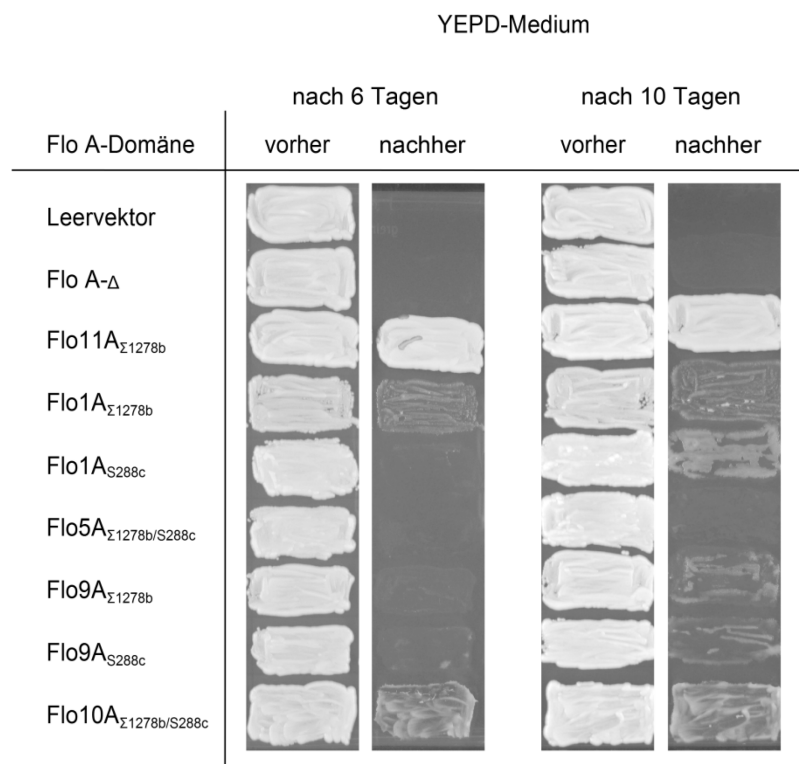


Abb. 2.4: Waschttest zur Überprüfung der Agar-Adhäsion durch die FloA-Domänen. Dabei konnte nach insgesamt 6 Tagen Inkubation neben der Flo11A-Positivkontrolle die Adhäsion an Agar durch Flo10A nachgewiesen werden, gefolgt von Flo1A aus dem Laborstamm $\Sigma 1278b$. Auch für die Flo1A-Domäne aus dem Laborstamm S288c, sowie für die Flo9A-Domänen aus beiden Stämmen konnte Adhäsionsvermögen an Agar gezeigt werden, allerdings erst nach einer längeren Inkubationszeit von insgesamt 10 Tagen. Die Adhäsion von Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ und Flo10A blieb während dieser Zeit unverändert. Flo5A zeigte keinerlei Adhäsion an Agar.

Zusammenfassend konnte durch den Vergleich der Ergebnisse des Flokkulations- und Agar-Adhäsionstests gezeigt werden, dass die getesteten PA14-artigen FloA-Domänen bis auf Flo5A und Flo9A $_{\Sigma 1278b}$ duale Adhäsionseigenschaften besitzen, was sie befähigt, sowohl Zell-Zell als auch Zell-Oberflächen Adhäsion zu vermitteln (Abb. 2.3, Abb. 2.4, Tab. 2.2). Eine starke Flokkulation geht aber nicht unbedingt mit einer ebenfalls starken Agar-Adhäsion einher, was besonders am Beispiel von Flo5A deutlich wird. Demnach handelt es sich bei der Agar-Adhäsion um einen anderen Adhäsionsmechanismus als bei der Flokkulation, was bereits in früheren Veröffentlichungen ebenfalls vermutet wurde (Guo *et al.*, 2000). Welcher Mechanismus dahinter steht ist bislang jedoch nicht bekannt. Es wurde zunächst angenommen, dass ein Zusammenhang zur erhöhten Zell-Hydrophobizität besteht, welche begleitend ist zur Anwesenheit von Flo-Proteinen in der Zellwand. Van Mulders *et al.* legten jedoch bereits in ihrer Veröffentlichung 2009 nahe, dass die zelluläre Hydrophobizität generell unterstützend auf jede Art von Adhäsion wirkt.

Tab. 2.2: Zusammenfassung der *in vivo* Testergebnisse für verschiedene FloA-Domänen aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c. +++ = starke Adhäsion, ++ = mittelstarke Adhäsion, + = schwache Adhäsion, - = keine Adhäsion nachweisbar.

FloA-Domäne	Zell-Zell Adhäsion	Agar-Adhäsion
Leervektor	-	-
FloA- Δ	-	-
Flo11A $_{\Sigma 1278b}$	-	+++
Flo1A $_{\Sigma 1278b}$	++	+
Flo1A $_{S288c}$	++	+
Flo5A $_{\Sigma 1278b/S288c}$	+++	-
Flo9A $_{\Sigma 1278b}$	-	+
Flo9A $_{S288c}$	+	+
Flo10A $_{\Sigma 1278b/S288c}$	+	++

Diese Theorie wird in dieser Arbeit unterstützt, da beispielsweise die Proteinsequenzen von Flo5A und Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ eine hohe gegenseitige Übereinstimmung aufweisen (95 %, Abschnitt 1.4.5), sie sich jedoch in ihrem Adhäsionsvermögen an Agar stark voneinander unterscheiden. Ein weiteres Beispiel ist die stärkere Adhäsion von Flo10A und Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ an Agar, welche bereits nach 6 Tagen Inkubation nachweisbar war und auch nach einer längeren

Inkubationszeit konstant blieb. Im Gegensatz dazu konnten für Flo1A_{S288c} und die beiden Flo9A-Domänen erst nach 10 Tagen leichte Agar-Adhäsion nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen Adhäsionsstärken an Agar und auch die konstante Adhäsionsstärke von Flo10A und Flo1A_{Σ1278b} könnten darauf hindeuten, dass es sich bei der Agar-Adhäsion, wie auch bei der Flokkulation, um die Bindung eines Liganden handelt. Dieser wird von den verschiedenen PA14-artigen FloA-Domänen entweder unterschiedlich stark gebunden, oder aber es wird beispielsweise von Flo10A und Flo1A_{Σ1278b} ein anderer Ligand erkannt als von Flo1A_{S288c}, Flo9A_{Σ1278b}, und Flo9A_{S288c}.

2.2 Analyse der Subdomänen von Flo5A und Flo10A

2.2.1 Herstellung und Expression von Flo5A- und Flo10A-Varianten mit verschiedenen Subdomänen

Nachdem beim Vergleich der FloA-Proteinsequenzen besonders große Unterschiede im Bereich der Subdomäne zwischen Flo10A und Flo1A, Flo5A, und Flo9A sichtbar wurden (Abb. 1.7), sollte der Einfluss der Subdomäne auf die Funktion der verschiedenen FloA-Domänen untersucht werden. Dazu wurden zum einen Konstrukte hergestellt, bei denen die Subdomäne von Flo5 und Flo10 innerhalb der A-Domäne deletiert worden war (Bachelorarbeit Benedikt von der Heyde). Um die Proteinkonformation zu erhalten, wurden die deletierten Subdomänen jeweils durch eine flexible G4S-Brücke ersetzt. Die Deletion der Subdomänen erfolgte dabei über eine Whole-Vector-PCR, bei der einer der Primer die G4S-Brücke enthielt. Die daraus resultierenden Domänen *FLO5^{ΔSD}* und *FLO10A^{ΔSD}* wurden ebenfalls, wie schon in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, in den auf *FLO11*-basierenden Expressionsvektor inseriert (Abb. 2.5, Tab. 2.3).

Neben der Deletion der Subdomänen wurden diese zusätzlich zwischen der Flo5A- und Flo10A-Domäne gegenseitig ausgetauscht (Abb. 2.5, Tab. 2.3). Der Austausch erfolgte allerdings nicht über Klonierung, sondern durch direkte Synthese der gewünschten *FLOA*-Domänen durch die Firma Geneart AG. Die funktionale Überprüfung der Subdomäne erfolgte anschließend, wie schon in Abschnitt 2.1 beschrieben, mit Hilfe eines Flokkulations- und Agar-Adhäsionstests zusammen mit den nativen Flo5A- und Flo10A-Domänen (BHUM2295 und BHUM2300, Tab. 2.1). Dabei wurde für diese Konstrukte während des Flokkulationstests

zusätzlich der inhibitorische Einfluss von freier Glukose auf die Zell-Zell Adhäsion gemessen, um neben Mannose auch für dieses Saccharid das Flokkulationsverhalten mit

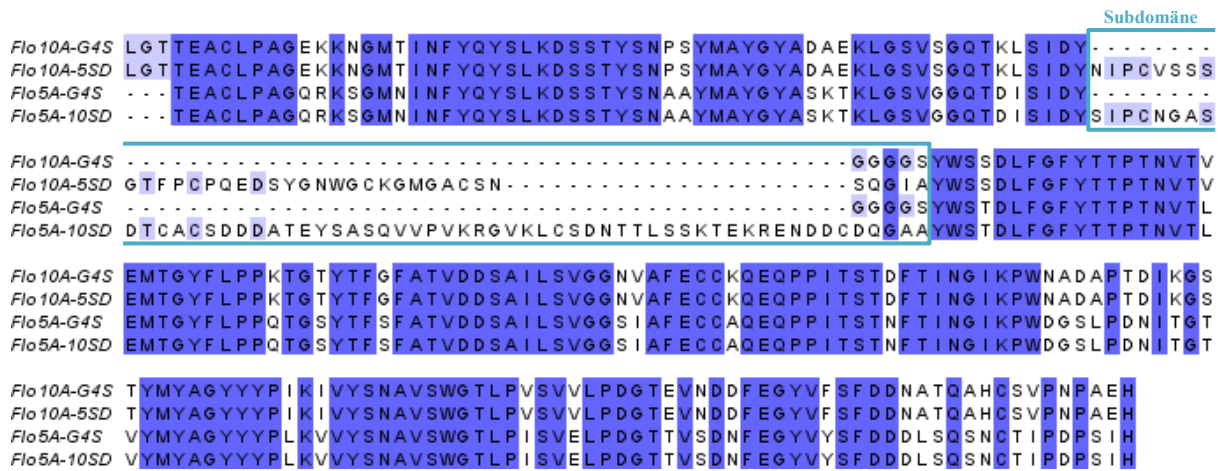


Abb. 2.5: Vergleich der Proteinsequenzen aller Subdomänen-Testkonstrukte von Flo5A und Flo10A. Neben den Deletionskonstrukten Flo5A^{ΔSD} (Flo5A-G4S) und Flo10A^{ΔSD} (Flo10A-G4S), in denen die Subdomäne durch eine G4S-Brücke ersetzt wurde, erfolgte der Austausch der Subdomänen zwischen Flo5A und Flo10A (Flo10A^{5SD} und Flo5A^{10SD}).

in vitro Testergebnissen von aufgereinigten FloA-Domänen korrelieren zu können (Abschnitt 2.3.1) und um festzustellen, ob sich durch die Deletion oder den Austausch der Subdomänen das Ligandenspektrum der jeweiligen FloA-Domänen verändert hat. Dadurch sollte u.a. ein Vergleich zu LgFlo1 aus *Saccharomyces pastorianus* erzielt werden, welches bereits in seiner ursprünglichen Form keine Subdomäne enthält und beide Saccharide als Liganden bindet.

Tab. 2.3: Übersicht über die Subdomänen-Testkonstrukte, welche für die *in vivo* Tests verwendet wurden, zusammen mit den Kontrollen B2445, BHUM2157, und BHUM2158.

Konstrukt	Bezeichnung in der Stammsammlung
Leervektor	B2445
<i>FLOA-Δ-FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2157
<i>FLO11A</i> _{Σ1278b} - <i>FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2158
<i>FLO5A</i> ^{10SD} - <i>FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2852
<i>FLO5A</i> ^{ΔSD} - <i>FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2853
<i>FLO10A</i> ^{5SD} - <i>FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2854
<i>FLO10A</i> ^{ΔSD} - <i>FLO11BC</i> _{Σ1278b}	BHUM2855

Als Kontrollen dienten während der *in vivo* Tests mit den Subdomänen-Testkonstrukten die gleichen Stämme, welche bereits in Abschnitt 2.1 verwendet wurden. Dazu zählten der Leervektor ohne *FLO*-Gen (B2445), das *FLO11*_{Σ1278b}-Gen ohne A-Domäne (*FLOA-Δ*) und das vollständige *FLO11*_{Σ1278b}-Gen.

Nach der Herstellung der Subdomänen-Varianten (Tab. 2.3) wurden diese zunächst in den nicht-adhäsiven *S. cerevisiae*-Stamm YHUM0924 gebracht und anschließend die Expression und Präsenz der entsprechenden FloA-Domänen in die Zellwand von *S. cerevisiae* fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

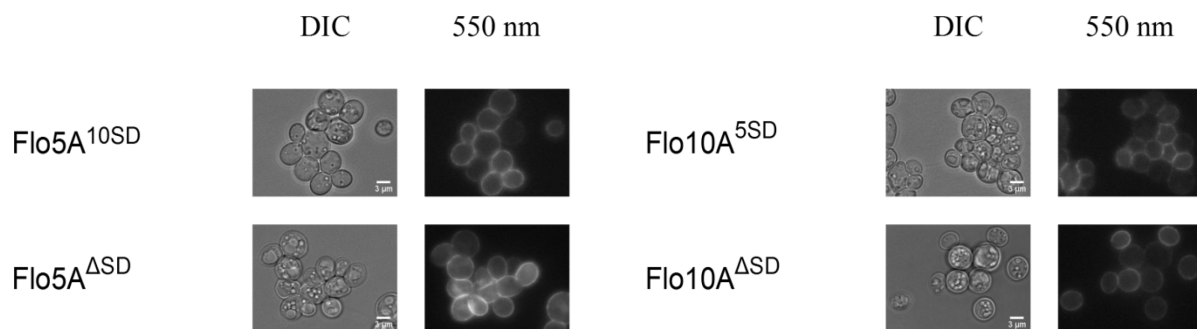


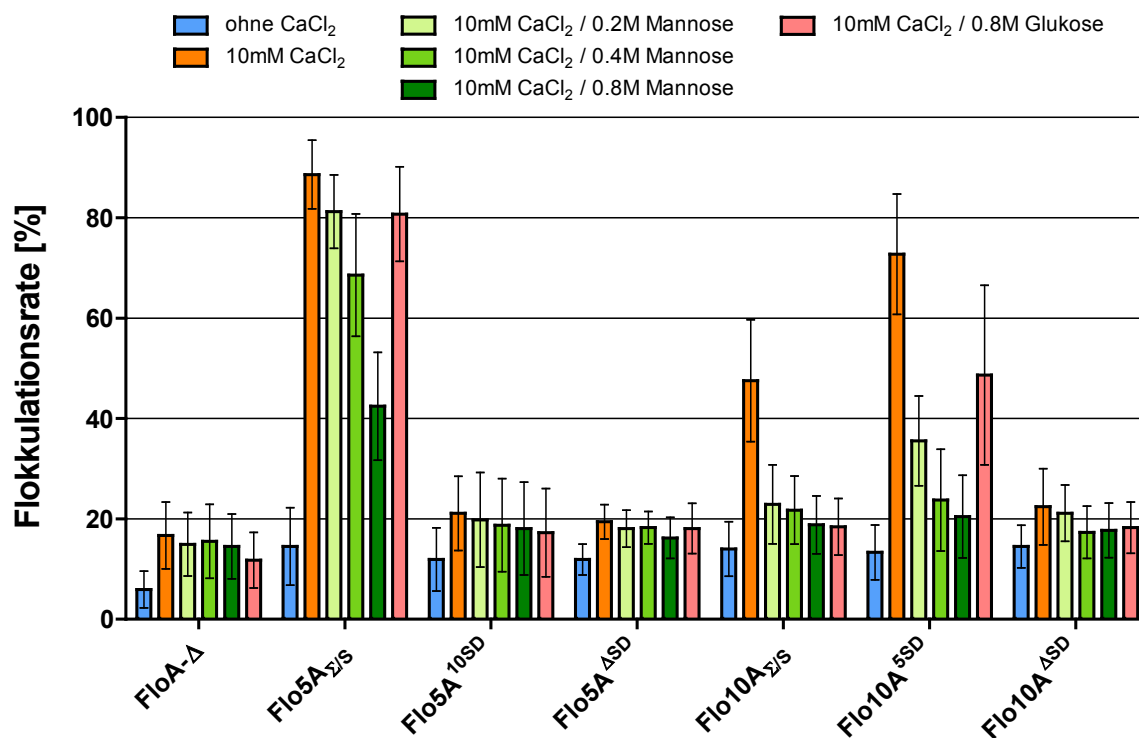
Abb. 2.6: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Subdomänen-Testkonstrukte in der Zellwand von *S. cerevisiae*. Für alle getesteten Stämme konnte dabei eine gleich starke Fluoreszenz nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden die gleichen Stämme wie in Abschnitt 2.1 verwendet, deren Nachweis auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* in Abb. 2.2 zu sehen ist. Der Größenstandard gibt 3 µm an.

Bei allen Subdomänen-Varianten konnte dadurch die Anwesenheit der rekombinanten Flokkuline in der Zellwand nachgewiesen werden. Der Nachweis der Kontrollen in der Zellwand ist in Abb. 2.2 zu sehen. Insgesamt war die Fluoreszenzstärke bei allen Stämmen miteinander vergleichbar. Als nächstes wurden, wie bereits in Abschnitt 2.1 beschrieben, funktionale Tests durchgeführt, welche Aufschluss über das Zell-Zell und Zell-Oberflächen Adhäsionsvermögen der einzelnen FloA-Domänen geben sollten.

2.2.2 Vermittlung von Zell-Zell Adhäsion durch FloA-Domänen ohne Subdomäne und durch chimäre FloA-Domänen

Um das Zell-Zell Adhäsionsvermögen der Subdomänen-Varianten zu testen, wurde erneut ein Flokkulationstest durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde, im Gegensatz zum Flokkulationstest mit den ursprünglichen FloA-Domänen (Abschnitt 2.1.2), lediglich das

Flo11-Konstrukt ohne A-Domäne verwendet da für die *S. cerevisiae*-Stämme mit dem Leervektor und Flo11A $_{\Sigma 1278b}$ bereits nachgewiesen werden konnte, dass diese keine Zell-Zell Adhäsion vermitteln können. Die Verwendung der FloA- Δ -Kontrolle diente dabei der Überprüfung der Hintergrundaktivität, welche auf die Flo11B-Domäne zurückzuführen ist.



S. cerevisiae-Stämme

Abb. 2.7: Flokkulationsverhalten der FloA-Domänen ohne Subdomäne, der Subdomänen-Austauschkonstrukte, und der nativen Flo5 und Flo10 A-Domänen. Die Messwerte stellen den Mittelwert und die Standardabweichung SD von mindestens acht einzelnen Werten dar. Flo5A zeigte das stärkste Flokkulationsverhalten und die geringste Sensitivität gegenüber freier Mannose und Glukose. Flo10A^{5SD} wies zwar eine niedrigere Flokkulationsrate als Flo5A auf, war aber gegenüber freier Saccharide deutlich sensibler. Die schwächste Flokkulation wurde für Flo10A gemessen, welche bereits durch vergleichsweise geringe Mannosekonzentrationen und durch Glukose inhibiert werden konnte. Für die Flo5A^{10SD}-Domäne und auch die Flo5 und Flo10 A-Domänen ohne Subdomäne (Flo5A ^{Δ SD} und Flo10A ^{Δ SD}) konnte keinerlei Flokkulationsvermögen nachgewiesen werden.

Beim Flokkulationstest wies die Negativkontrolle FloA- Δ wie schon in vorherigen Zell-Zell Adhäsionstests eine Flokkulationsrate von 17 % auf, während die stärkste Flokkulation erneut für Flo5A nachgewiesen wurde mit einer Flokkulationsrate von 89 % (Abb. 2.3, 2.7). Wie erwartet war die durch Flo5A vermittelte Flokkulation durch steigende Mannosekonzentrationen zunehmend inhibierbar und erreichte nach der Zugabe von 0,8 M Mannose nur noch eine Adhäsionsrate von 42 %. Im Gegensatz dazu konnte durch 0,8 M

Glukose die Adhäsionsrate nur auf 81 % gesenkt werden was erwartet wurde, nachdem Veelders *et al.* bereits nachgewiesen hatten dass Glukose von Flo5A nur unspezifisch gebunden wird (Veelders *et al.*, 2010). Auch Flo10A wies, basierend auf früheren Adhäsionstests, im Flokkulationstest das erwartete Adhäsionsverhalten auf (Abb. 2.7, Abb. 2.3). Dabei betrug die maximale Flokkulationsrate 48 %, welche durch bereits geringe Mannosekonzentrationen vollständig inhibiert werden konnte. In diesem Test wurde jedoch erstmals auch der Einfluss von freier Glukose auf die durch Flo10A-vermittelte Zell-Zell Adhäsion gemessen wobei sich herausstellte, dass diese die Flokkulation unterbindet. Dieses Ergebnis lieferte bereits einen ersten Hinweis, dass Glukose von Flo10A stärker gebunden wird als von Flo5A. Um überhaupt Zell-Zell Adhäsion vermitteln zu können bedarf es einer vollständigen FloA-Domäne, bestehend aus einer PA14-Domäne und einer Flo-spezifischen Subdomäne. Die PA14-Domäne alleine ist *in vivo* nicht funktionell, da sowohl für Flo5A^{ΔSD} als auch für Flo10A^{ΔSD} im Flokkulationstest keine Adhäsion nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.7). Die durch eine bestimmte FloA-Domäne maximal erreichbare Flokkulationsrate ist demnach zum einen abhängig von ihrer Vollständigkeit, als auch von der Art der Subdomäne. Dies zeigt der Vergleich der chimären Flo5A^{10SD}- und Flo10A^{5SD}- Domänen. Die Flo5A^{10SD}-Domäne, welche die Subdomäne von Flo10A zusammen mit der Flo5A PA14-Domäne enthält, konnte keine oder nur noch eine so schwache Zell-Zell Adhäsion vermitteln, dass diese in diesem Test nicht mehr nachweisbar war. Demnach stellt die ursprüngliche Flo10A-Domäne in ihrer Gesamtheit eine optimierte Version dar welche in der Lage ist, schwache Flokkulation zu vermitteln. Wird dagegen die Flo10A PA14-Domäne mit der Flo5A-Subdomäne kombiniert, wie in der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne, kann die Flokkulationsrate gegenüber Flo10A von 48 % auf 73 % stark erhöht werden (Abb. 2.7). Dies hebt die Bedeutung der Subdomäne für die Adhäsion *in vivo* nochmals stark hervor, jedoch erreichte die maximale Flokkulationsrate von Flo10A^{5SD} nicht die von Flo5A, was ebenfalls auf eine funktionale Optimierung zwischen der Flo5A PA14-Domäne und der Subdomäne hinweist. Auch wenn von Flo10A^{5SD} nicht die gleiche maximale Flokkulationsrate erreicht werden konnte wie von Flo5A wies die chimäre FloA-Domäne eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber freier Mannose und eine etwas höhere Sensitivität gegenüber freier Glukose auf was darauf hinweist, dass beide Saccharide von Flo10A^{5SD} stärker gebunden werden als von Flo5A. Wie schon anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 2.1.2 vermutet weist das unterschiedliche Inhibitionsverhalten von Flo5A und Flo10A^{5SD} darauf hin, dass die Stärke der Ligandenbindung von Mono- und Disacchariden innerhalb der primären

Bindetasche nicht unbedingt mit der maximalen Flokkulationsrate *in vivo* korreliert, und evtl. weitere Bindemöglichkeiten ebenfalls eine Rolle spielen.

2.2.3 Messung der Agar-Adhäsion, welche durch FloA-Domänen ohne Subdomäne und durch chimäre FloA-Domänen vermittelt wird

Beim Agar-Adhäsionstest mit den Subdomänen-Testkonstrukten wurden, wie schon zuvor (Abschnitt 2.1.3), *S. cerevisiae*-Stämme mit dem Leervektor ohne *FLO*-Gen und dem Vektor mit *FLO11*_{Σ1278b} ohne A-Domäne (*FLOA-Δ*) als Negativkontrollen verwendet. Der Stamm mit dem vollständigen *FLO11*_{Σ1278b}-Gen diente als Positivkontrolle da bereits bekannt war, dass Flo11A_{Σ1278b} Adhäsion an Agar vermitteln kann. Im Adhäsionstest konnte nachgewiesen werden, dass wann immer eine vollständige FloA-Domäne vorhanden war von der entweder die PA14-Domäne oder die Subdomäne aus Flo10A stammten, die entsprechende FloA-Domäne Agar-Adhäsion vermitteln konnte (Abb. 2.8).

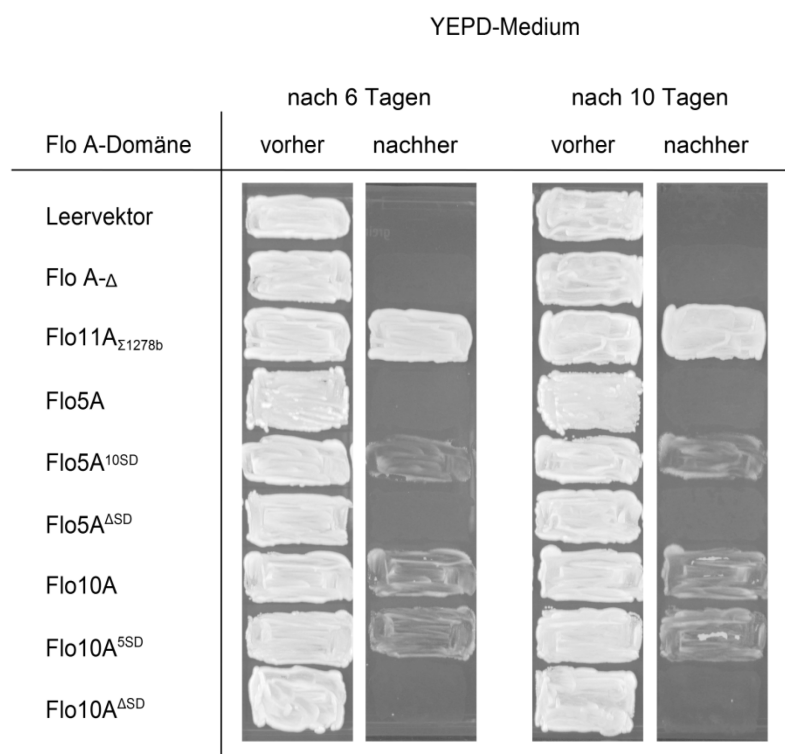


Abb. 2.8: Waschtest zur Überprüfung der Agar-Adhäsion durch die Subdomänen-Testkonstrukte. In diesem Test konnten alle FloA-Domänen welche aus einer Flo10 PA14-Domäne und/oder der Flo10-Subdomäne zusammengesetzt waren an Agar adhärieren. Dagegen konnte die Flo10 PA14-Domäne alleine keine Agar-Adhäsion vermitteln, was anhand von Flo10A^{ΔSD} nachgewiesen wurde. Auch die vollständige Flo5A-Domäne oder dessen PA14-Domäne (Flo5A^{ΔSD}) wiesen keine Adhäsion auf.

Dementsprechend wiesen die Flo10A-, die Flo10A^{5SD}- und die Flo5A^{10SD}- Domäne Adhäsion an Agar auf. Die PA14-Domäne von Flo10A (Flo10A^{ΔSD}) konnte alleine nicht an Agar adhären. Ebenso wenig konnten die vollständige Flo5A-Domäne als auch dessen PA14-Domäne (Flo5A^{ΔSD}) adhären, was basierend auf früheren Ergebnissen (Abschnitt 2.1.3) zumindest für Flo5A erwartet wurde.

Zusammenfassend konnte anhand des Flokkulations- und des Agar-Adhäsionstest mit Subdomänen-Testkonstrukten basierend auf Flo5A und Flo10A gezeigt werden, dass eine vollständige FloA-Domäne, bestehend aus einer PA14-Domäne und einer Subdomäne, Voraussetzung ist damit diese Adhäsion vermitteln kann. Darüber hinaus konnte im Flokkulationstest die Bedeutung der Subdomäne auf die Funktion der jeweiligen FloA-Domäne hervorgehoben werden, da durch den Zusammenschluss der Flo10A PA14-Domäne mit der Flo5A Subdomäne die maximale Flokkulationsrate der daraus resultierenden Flo10A^{5SD}-Domäne gegenüber der vollständigen Flo10A-Domäne stark erhöht war (Abb. 2.7, Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Zusammenfassung der *in vivo* Testergebnisse für die Subdomänen austausch- und Deletionskonstrukte. +++ = starke Adhäsion, ++ = mittelstarke Adhäsion, + = schwache Adhäsion, - = keine Adhäsion nachweisbar, n.m. = nicht gemessen.

FloA-Domäne	Zell-Zell Adhäsion	Agar-Adhäsion
Leervektor	n.m.	-
FloA-Δ	-	-
Flo11A _{Σ1278b}	n.m.	+++
Flo5A _{Σ1278b/S288c}	+++	-
Flo5A ^{10SD}	-	+
Flo5A ^{ΔSD}	-	-
Flo10A _{Σ1278b/S288c}	+	++
Flo10A ^{5SD}	++	++
Flo10A ^{ΔSD}	-	-

Im Agar-Adhäsionstest konnten dagegen sowohl die Flo10A PA14-Domäne als auch die Flo10A Subdomäne innerhalb einer vollständigen FloA-Domäne Agar-Adhäsion vermitteln, wonach bei dieser Art der Adhäsion nicht nur die Subdomäne ausschlaggebend ist. Die Flo10A

PA14-Domäne alleine konnte dagegen nicht an Agar adhären sondern nur in Verbindung mit einer Subdomäne, in diesem Fall der Flo5A Subdomäne (Abb. 2.8). Dies legt abermals, wie schon in Abschnitt 2.1 vermutet, die Bindung eines Liganden bei der Agar-Adhäsion nahe.

2.3 Biochemische Analyse ausgewählter FloA-Domänen

2.3.1 Bestimmung von Ligandenbindungskonstanten mittels Fluoreszenz-Spektroskopie

Nachdem die Ergebnisse aus dem Flokkulationstest mit chimären FloA-Domänen ergaben, dass die Flo10A^{SSD}-Domäne zwar eine niedrigere maximale Flokkulationsrate im Vergleich zu Flo5A, dafür aber eine höhere Affinität gegenüber freier Mannose und Glukose aufweist, sollte dieses Ergebnis zusätzlich durch *in vitro* Test bestätigt und genauer quantifiziert werden. Auch die deutlich schwächere Affinität von Flo10A sollte auf diesem Wege genauer bestimmt werden. Flo5A wurde während dieser Messungen als Positivkontrolle verwendet, da entsprechende Messungen bereits durchgeführt worden waren (Veelders *et al.*, 2010). Als Negativkontrolle sollte die Subdomänen-deletierte Flo5A^{ASD}-Domäne dienen, nachdem für diese *in vivo* keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Um die genaue Affinität dieser Adhäsionsdomänen gegenüber ausgewählten Sacchariden bestimmen zu können, wurden diese zunächst in *E. coli* hergestellt, gereinigt, und anschließend mittels Fluoreszenz-Spektroskopie die Dissoziationskonstanten ermittelt. Als Saccharide wurden D-Mannose, α -1,2-Mannobiose, D-Galaktose und D-Glukose verwendet. Erstere waren dabei für den Vergleich zwischen den *in vivo* gemessenen Flokkulationsraten und den *in vitro* bestimmten Dissoziationskonstanten interessant, da während der Zell-Zell Adhäsion Mannose, insbesondere α -1,2-Mannobiose, in der Zellwand benachbarter Zellen gebunden wird. Für Galaktose wird spekuliert, dass dieses Glykan als Ligand bei der Adhäsion an Agar dienen könnte. Glukose spielt für die „NewFlo-Type“ Flokkulation, wie sie beispielsweise von LgFlo1 vermittelt wird, eine Rolle und sollte zusätzlich als Test dienen, ob sich durch den Austausch der Subdomäne auch das Ligandenspektrum von Flo10A^{SSD} verändert hatte da Flo5A Glukose nur unspezifisch bindet.

Die Herstellung der Proteine erfolgte mit dem pET-System, welches auf der Expression durch die virale T7 RNA-Polymerase beruht (Studier and Moffatt, 1986). In diesem System befindet

sich eine Kopie des viralen T7 RNA-Polymerase Gens im Genom der *E. coli*-Wirtszellen, welches unter der Kontrolle des *lac*-Promotor und *lac*-Operators steht. Das Gen des zu synthetisierenden Proteins befindet sich dagegen auf einem pET28a-Vektor und steht seinerseits unter der Kontrolle des T7-Promotors und des *lac*-Operators. Nimmt die Zelle das zu Laktose analoge IPTG auf, bewirkt dieses eine Konformationsänderung des *lacI*-Repressors am *lac*-Operator, wodurch die Transkriptionseinhibition des *lac*-Promotors als auch des T7-Promotors aufgehoben wird. Letztendlich erfolgt durch die Bindung der T7 RNA-Polymerase an den T7-Promotor die Synthese des gewünschten Proteins. Die *FLOA*-Gensequenzen wurden dementsprechend in den pET28a-Vektor inseriert. Dabei wurde die Ligation so durchgeführt, dass das später synthetisierte Protein mit einem N-terminalen His-Tag versehen war mit dessen Hilfe die nachfolgende Aufreinigung stattfand. Die Synthese fand danach in dem *E. coli*-Stamm Shuffle[®] T7 statt und wurde durch 1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Nach der Synthese wurden die *E. coli*-Zellen abzentrifugiert, mit Hilfe eine French-Press aufgeschlossen, und das gewünschte Protein zunächst in einer Affinitätschromatographie mit Ni-NTA vom Rest der Zellproteine getrennt. Bei diesem Schritt wurde das His-Tag zunächst durch Nickel gebunden und danach in einem Imidazol-Gradienten bis zu 500 mM wieder vom Säulenmaterial gelöst. Das Protein wurde aufgefangen, aufkonzentriert, und in einer Größenausschlusschromatographie sortiert. Monomeres Protein wurde dann erneut aufkonzentriert, die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und eine mit DTT reduzierte Probe des Proteins auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen um anhand der Größe festzustellen, ob es sich um das erwartete Protein handelte (Abb. 2.9, Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Physikalische Parameter der in *E. coli* synthetisierten FloA-Domänen. Die Angaben dienen u.a. dazu, nach der Aufreinigung aus *E. coli* die Menge des jeweils erhaltenen Proteins spektrophotometrisch zu bestimmen, woraus sich die Ausbeute berechnen lässt.

Protein	Molekulargewicht [kDA]	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Ausbeute [mg Protein / L Kultur]
Flo5A ^{AS23-271}	29,1	52300	1,5 - 0,8
Flo5A ^{ASD}	25,4	45060	0,6
Flo10A ^{AS23-299}	32,2	45435	0,1 - 0,05
Flo10A ^{ASD}	29,2	50810	2,1 - 1,5

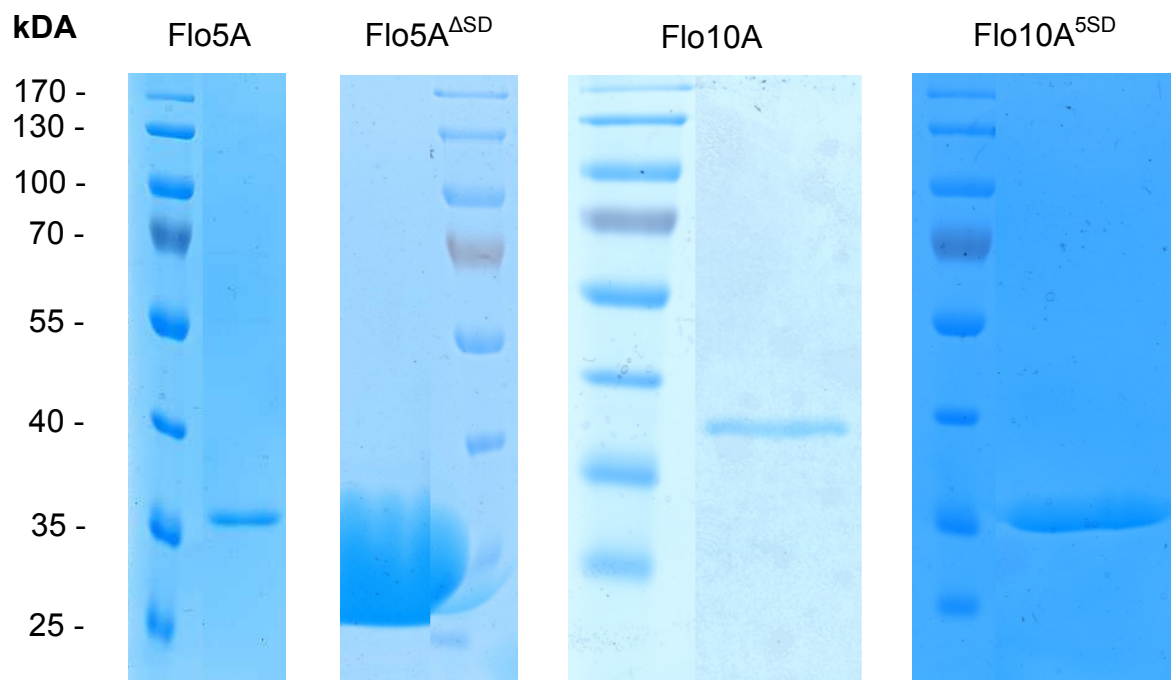


Abb. 2.9: Auftragung einer Probe der in *E. coli* synthetisierten Proteine auf 10 %-ige SDS-Gele nach der Größenausschlusschromatographie. Dadurch sollte festgestellt werden, ob es sich um das erwartete Protein handelt, was durchweg bestätigt werden konnte. Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet.

Nach der Aufreinigung der Proteine aus *E. coli* wurde deren Affinität zu den bereits erwähnten Sacchariden in einer Fluoreszenz-Titration, basierend auf der Fluoreszenz intrinsischer Tryptophane, gemessen. Dabei wurden bestimmte Mengen des Saccharids einer Proteinlösung zugegeben, und die Löschung der Fluoreszenz gemessen. Diese kommt dann zustande, wenn sich der Ligand und ein Tryptophan in räumlicher Nähe zueinander befinden. Die Anregungsenergie des Tryptophans kann dabei auf den Liganden übertragen werden, welcher selbst jedoch nicht fluoresziert wodurch es zur Fluoreszenzlöschung kommt. Die prozentuale Fluoreszenzlöschung, im Vergleich zur Fluoreszenz ohne Zugabe eines Liganden, wurde dann gegen die Konzentration des Saccharids mit Hilfe des Programms „Graph Pad Prism 5“ aufgetragen (Abb. A1, siehe Anhang). Mit diesem wurde auch die Dissoziationskonstante K_d in einem nicht-linearen Fit, unter der Erwartung einer spezifischen Bindung an eine Bindungsstelle, mit Hilfe von folgender Formel berechnet:

Formel I:
$$Y = \frac{Y_{\max} \times X}{(K_d + X)}$$

Y = Prozentualer Fluoreszenzquench, Y_{\max} = Maximaler Fluoreszenzquench

X = Ligandenkonzentration, K_d = Dissoziationskonstante

Die gleichen Messwerte wurden darüber hinaus in Form eines Scatchard-Plots aufgetragen. Bei einem nicht-allosterischen Bindungsverhalten wird dabei eine abfallende Gerade erwartet, was bis auf die Messung von Flo10A mit Galaktose immer zutrif (siehe Anhang A1a-d). Die mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie gemessenen Dissoziationskonstanten sind in Tab. 2.6 und in Abb. 2.10 zusammengefasst.

Tab. 2.6: Dissoziationskonstanten der aufgereinigten Flo-Adhäsionsdomänen zu ausgewählten Sacchariden. Die K_d -Werte wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt. Für jede Protein-Saccharid Kombination wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Bei den Messungen Flo5A^{ASD} mit D-Galaktose, sowie Flo10A mit α -1,2-Mannobiose konnten jedoch nur zwei, bzw. eine Messung ausgewertet werden. Zusätzlich sind die entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die Messung Flo10A mit D-Galaktose ergab bis 300 mM Galaktose eine Gerade, wodurch die Dissoziationskonstante mit mindestens 150 mM angegeben ist. * Einzelmessung. ** Zwei Messungen.

Protein	D-Mannose [mM]	α -1,2-Mannobiose [mM]	D-Galaktose [mM]	D-Glukose [mM]
Flo5A ^{AS23-271}	45 \pm 7,1	3,7 \pm 1,2	keine Bindung	280 \pm 69
Flo5A ^{ASD}	46 \pm 6,5	4,0 \pm 1,1	272 \pm 81**	276 \pm 113
Flo10A ^{AS23-299}	86 \pm 17	7,0*	>150 mM*	189 \pm 88
Flo10A ^{5SD}	1,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0	keine Bindung	69 \pm 2,5

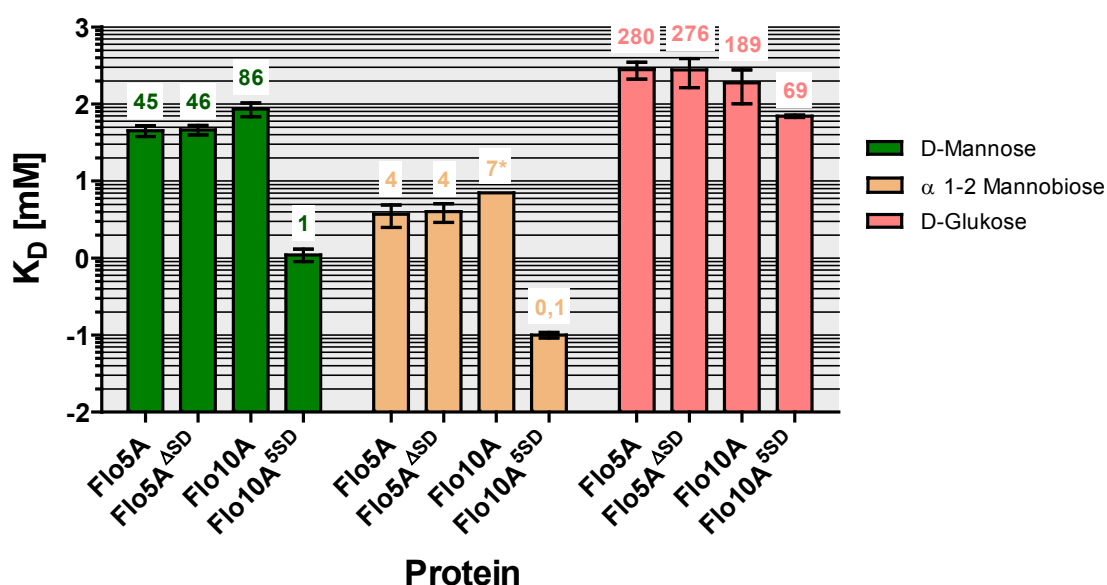


Abb. 2.10: Graphische Übersicht über die gemessenen Dissoziationskonstanten. Während Flo5A und Flo5A^{ASD} vergleichbare K_d -Werte gegenüber den jeweiligen Sacchariden aufweisen, ist die Bindung von Flo10A gegenüber D-Mannose und α -1,2-Mannobiose um etwa die Hälfte schwächer. Glukose wird dagegen im Vergleich etwas stärker von Flo10A gebunden. Die chimäre Adhäsionsdomäne Flo10A^{5SD} weist zu allen Sacchariden eine deutlich höhere Affinität als die nativen Flo5 und Flo10-Adhäsionsdomänen auf.

Jede Protein-Ligand Kombination wurde dreimal an jeweils unterschiedlichen Tagen gemessen. Die Messungen mit Flo10A erwiesen sich jedoch als schwierig, da teilweise die Sättigung nicht erreicht, oder die Sättigungskurven zu diffus und damit nicht auswertbar waren (Tab. 2.6). Für Flo5A und Flo5A^{ΔSD} ergaben die Messungen mit D-Mannose, α-1,2-Mannobiose und D-Glukose vergleichbare K_d -Werte, obwohl Flo5A^{ΔSD} in den *in vivo* Messungen (Abschnitt 2.2) keine adhäsiven Eigenschaften aufwies. Zusätzlich war Flo5A^{ΔSD} in der Lage D-Galaktose zu binden, im Gegensatz zu Flo5A, wonach durch die Deletion der Subdomäne die Ligandenspezifität dieser FloA-Domäne aufgehoben wurde. Flo10A wies eine etwa halb so starke Affinität zu D-Mannose und α-1,2-Mannobiose auf wie Flo5A und Flo5A^{ΔSD}. Dafür konnte D-Glukose von Flo10A stärker gebunden werden. Diese Ergebnisse stehen in guter Korrelation zu den *in vivo* gemessenen maximalen Flokkulationsraten von Flo5A und Flo10A, sowie deren Inhibitionsverhalten gegenüber freien Sacchariden (Abb. 2.3 und Abb. 2.7). Einzig die Flokkulationsinhibition von Flo10A durch freie D-Mannose scheint *in vivo* zu stark ausgeprägt zu sein was darauf zurückzuführen sein könnte, dass bei einer ohnehin schwachen Flokkulation freie Saccharide stärker und schneller gebunden werden als Oligosaccharide in benachbarten Zellwänden. Die chimäre Flo10A^{5SD}-Adhäsionsdomäne konnte sowohl D-Mannose als auch α-1,2-Mannobiose bis zu 40-fach stärker binden als die native Flo5A-Domäne. Die Affinität zu D-Glukose war um das 4-fache erhöht. Eine Bindung von D-Galaktose konnte aber, wie auch für Flo5A, nicht nachgewiesen werden. Demnach konnte die Ligandenspezifität von Flo5A mit Hilfe seiner Subdomäne innerhalb der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne erhalten werden. Die *in vitro* nachgewiesene starke Erhöhung der Ligandenaffinität konnte *in vivo* jedoch nur anhand des Inhibitionsverhaltens von Flo10A^{5SD} gegenüber D-Mannose und D-Glukose beobachtet werden (Abb. 2.7). Die maximale Flokkulationsrate von Flo10A^{5SD} erreicht jedoch nicht die von Flo5A, was anhand der höheren Affinität von Flo10A^{5SD} gegenüber D-Mannose und α-1,2-Mannobiose zu erwarten gewesen wäre. Vermutlich spielt hier zusätzlich die Verknüpfung von α-1,2-Mannobiose mit weiteren Sacchariden in der Zellwand von *S. cerevisiae* eine entscheidende Rolle bezüglich der Zell-Zell Adhäsionsstärke.

Zusammenfassend konnte durch den Vergleich der Ligandenaffinitäten *in vitro* mit der Zell-Zell Adhäsion *in vivo* gezeigt werden, dass eine gute Korrelation zwischen beiden erreicht wird, sofern es sich um ursprüngliche FloA-Domänen wie Flo5A und Flo10A handelt. Für die chimäre Flo10A^{5SD}-Domäne stimmen die Ergebnisse dagegen nicht vollständig überein, da die gemessene maximale Flokkulationsrate niedriger ist als anhand der *in vitro* Ligandenaffinität erwartet. Aus beidem lässt sich schließen, dass es sich bei den

ursprünglichen FloA-Domänen um funktional angepasste Versionen handelt und dass nicht nur die Affinitätsstärke zwischen Protein und Ligand innerhalb der primären Bindetasche entscheidend ist für die letztendlich erreichbare maximale Flokkulationsrate. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Flo5A^{ASD}-Domäne die Rolle der Subdomäne bei der Ligandenspezifität nochmals hervorgehoben werden, da diese *in vitro* im Vergleich zu Flo5A ein erweitertes Ligandenspektrum aufweist. Allerdings ist sie *in vivo* nicht nur für die Ligandenspezifität entscheidend sondern auch für die Affinität im Allgemeinen, da für Flo5A^{ASD} keine Flokkulation nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.7). Dies könnte beispielsweise auf fehlende Protein-Ligand Bindungen zurückzuführen sein, welche durch Aminosäure-Seitenketten innerhalb der Subdomäne vermittelt werden wie Q98 und Q117 von Flo5A (Veelders *et al.*, 2010).

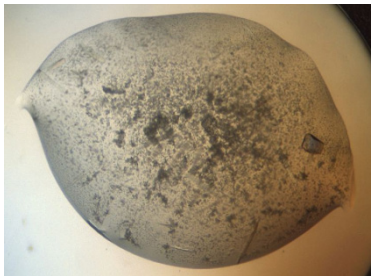
2.3.2 Kristallisation von Flo10A

Da bislang keine Struktur der Flo10-Adhäsionsdomäne vorhanden war, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, dies mit aus *E. coli* aufgereinigtem Protein zu erreichen. Für die Kristallisation von Flo10A wurde die aus *E. coli* aufgereinigte Adhäsionsdomäne zunächst mit CaCl₂ und D-Mannose versetzt. Das Auspipettieren des Proteins zusammen mit den von der Firma Qiagen fertig bereitgestellten Bedingungen für die Kristallisation wurde anschließend durch Dr. Holger Steuber und Ralf Pöschke vom LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie durchgeführt. Das Sammeln der Diffraktionsdaten erfolgte durch Michael Kock aus dem Fachbereich Chemie / Biochemie, welcher anschließend auch die Auflösung der Struktur zusammen mit Prof. Dr. Lars-Oliver Essen übernommen hat. Das Erstellen der Strukturabbildungen erfolgte wiederum in eigener Arbeit.

Die Kristallisation wurde im „sitting drop“-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das Protein zusammen mit den Kristallisationsbedingungen in einer speziell dafür vorgesehenen 96-Well Innovaplatte der Firma Innovadyne Technologies Inc. auspipettiert. Bei dieser Platte befindet sich an jeder der 96 Positionen eine größere Reservoir-Vertiefung zusammen mit zwei kleineren Vertiefungen. In das Reservoir werden zunächst 80 µl der Kristallisationsbedingung gegeben, aus der dann jeweils 300 nL in die beiden kleineren Vertiefungen pipettiert werden in denen die eigentliche Kristallisation stattfinden soll. Einer oder beide der Tropfen werden dann mit dem gleichen Volumen der Proteinlösung gemischt. Das Auspipettieren wurde mit

Hilfe des Roboters „Honeybee 963“ der Firma Digilab Inc. durchgeführt. Anschließend wurde die Platte mit einer VIEWseal™-Abdeckfolie der Firma Greiner Bio-One GmbH verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C oder 18 °C. Die genauen Bedingungen unter denen der Kristall für Flo10A erhalten wurde sind in Tab. 2.7 angegeben. Die Dokumentation des Kristallwachstums erfolgte während der Inkubation automatisch mit Hilfe des Rock Imager 1000 der Firma Formulatrix Inc.. Die Datensätze zur Lösung der Kristallstruktur wurden mit Hilfe der Photonenquelle BESSY II am Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH aufgenommen.

Tab. 2.7: Kristallisationsbedingungen und Strukturgenauigkeit von Flo10A.

	Flo10A ^{AS23-293}	
	Auspipettiert am:	31.08.12
	Kristallisationsbedingungen:	JCSG+ Suite (Qiagen) Well H10: 0,2 M Ammoniumacetat 0,1 M Bis-Tris pH 5,5 25 % (w/v) PEG 3350
	Inkubationstemperatur:	18 °C
	Ligand:	D-Mannose (Co-Kristallisation)
	Auflösungsgenauigkeit der Struktur:	1,65 Ångström

Wie in der Abb. 2.11a zu sehen ist, konnte die Struktur der PA14-Domäne von Flo10A (Grün) sowie einem kleinen Teil der Subdomäne (Blau) gelöst werden. Innerhalb der PA14-Domäne sind zwei Disulfidbrücken vorhanden (Orange). Die Struktur der Subdomäne ist bis zu deren ersten Disulfidbrücke zu sehen, welche sich vermutlich lokal stabilisierend auf die Struktur auswirkt. Der Rest der Subdomäne konnte nicht durch Kristallisation gelöst werden, was auf eine erhöhte Beweglichkeit oder alternative Disulfidbrückenbindung zurückgeführt wird, da sich im nicht-sichtbaren Teil der Subdomäne weitere drei Cysteine befinden (Abb. 2.11b). Die Bindung von Sacchariden erfolgt in Abhängigkeit von Calcium, welches in Abb. 2.11a durch eine orangene Kugel dargestellt ist.

h)

Domain	Flo10A	Flo10A_Kristall
1 (Blue Triangle)	LGTTEA	LGTTEA
2 (Orange Box)	LPAGEKKNGMTINFYQYSLKDSSTYSNP	LPAGEKKNGMTINFYQYSLKDSSTYSNP
3 (Green Box)	SYMAYGYADAELGSGVSGQTKLSIDY	SYMAYGYADAELGSGVSGQTKLSIDY
4 (Blue Box)	IPCN	IPCN
5 (Red Circle)	AS	-

Domain	Flo10A	Flo10A_Kristall
1 (Blue Triangle)	DTCACSDDDATEYSASQVVPVKRGVKLCSDNTT	DTCACSDDDATEYSASQVVPVKRGVKLCSDNTT
2 (Orange Box)	LSSKTEKREND	LSSKTEKREND
3 (Green Box)	DDQGAAYWSSDLFGFYTTPTNVT	DDQGAAYWSSDLFGFYTTPTNVT
4 (Blue Box)	VD	-
5 (Red Circle)	Q	-

Domain	Flo10A	Flo10A_Kristall
1 (Blue Triangle)	EMTGYFLPPKGTGYTFGFATVDDSA	EMTGYFLPPKGTGYTFGFATVDDSA
2 (Orange Box)	ILSVGGNVAFE	ILSVGGNVAFE
3 (Green Box)	CCQKEQPPITSTDF	CCQKEQPPITSTDF
4 (Blue Box)	TINGIKPWNADAPT	TINGIKPWNADAPT
5 (Red Circle)	DIKGS	DIKGS

Domain	Flo10A	Flo10A_Kristall
1 (Blue Triangle)	TYMYAGYYYPIKIVYSNAVSWGTL	TYMYAGYYYPIKIVYSNAVSWGTL
2 (Orange Box)	PVSVVLPDGEVNDDFEGYVFS	PVSVVLPDGEVNDDFEGYVFS
3 (Green Box)	FDDNATQAH	FDDNATQAH
4 (Blue Box)	CSVPNPAEH	CSVPNPAEH
5 (Red Circle)	CSVPNPAEH	CSVPNPAEH

Abb. 2.11: Kristallstruktur der Flo10A_{Σ1278b/S288c}-Domäne. (a) Dreidimensionale Struktur der Flo10A PA14-Domäne und Teile der Subdomäne. Es sind die PA14-Domäne (Grün) von Flo10A und Teile der Subdomäne (Blau), sowie darin enthaltene Disulfidbrücken (Orange) dargestellt. Das Ca²⁺-Ion in der primären Bindetasche ist als orangene Kugel zu sehen. Die Kristallisation erfolgte zusammen mit D-Mannose, welche durch die beiden Aspartat-Seitenketten von D160 und D161 innerhalb des DcisD-Motivs gebunden wird. Die Abstände zwischen dem Liganden und den jeweiligen Seitenketten sind in Ångström angegeben (Detailansicht oben rechts). Der in dunkelblau markierte Bereich der PA14-Domäne ist im Vergleich zu Flo5A zur primären Bindetasche hin abgeflacht. (b) Sequenzvergleich zwischen der ursprünglichen Flo10A Proteinsequenz und der Sequenz, wie sie im Kristall vorhanden ist. Darüber hinaus sind alle im Kristall vorhandenen Cysteine farblich hinterlegt. Welche Seitenketten zusammen eine Disulfidbrücke bilden ist anhand der Symbole vermerkt.

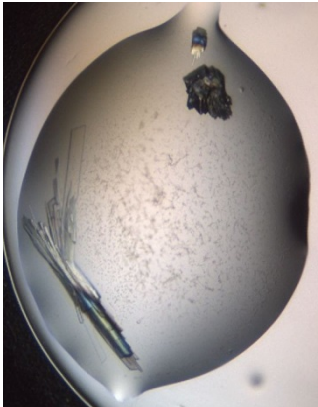
In dieser Abbildung ist auch die Bindung von D-Mannose durch das DcisD-Motiv, sowie die Abstände zwischen beiden in Ångström zu sehen (Detailansicht). Die Abstände zwischen dem DcisD-Motiv und D-Mannose unterscheiden sich dabei kaum zu den Abständen, wie sie in

Flo5A mit D-Mannose vorhanden sind (PDB-ID: 2XJP aus Veelders *et al.*, 2010). Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmals ein Großteil der Flo10A-Domäne strukturell aufgeklärt werden. Die Co-Kristallisation mit dem Liganden D-Mannose und die Analyse der Abstände zwischen Protein und Ligand konnten bisher jedoch keine Begründung liefern, warum die Flokkulationsrate von Flo10A niedriger ist im Vergleich zu Flo5A.

2.3.3 Kristallisation von Flo10A^{5SD}

Nachdem der Flokkulationstest und die *in vitro* Affinitätsmessungen mit Hilfe von Fluoreszenz-Spektroskopie ergaben, dass die chimäre Flo10A^{5SD}-Domäne gegenüber der ursprünglichen Flo5A-Domäne eine 40-fach höhere D-Mannose und α -1,2-Mannobiose-Affinität aufweist, sollte durch Kristallisation von Flo10A^{5SD} zusammen mit den Liganden eine mögliche Erklärung für die Affinitätssteigerung gefunden werden. Dabei erfolgte die Kristallisation, wie bereits für Flo10A in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, nach dem „sitting drop“-Verfahren. Das Auspipettieren der aus *E. coli* aufgereinigten chimären Flo10A^{5SD}-Adhäsionsdomäne zusammen mit den Kristallisationsbedingungen erfolgte durch Dr. Holger Steuber vom LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie.

Tab. 2.8: Kristallisationsbedingungen und Strukturgenauigkeit von Flo10A^{5SD}.

	Flo10A ^{5SD}	
	Auspipettiert am:	02.03.12
	Kristallisationsbedingungen:	Core III Suite (Qiagen) Well E8: 0,2 M Calciumacetat 0,1 M Natriumcacodylat pH 6,5 18 % (w/v) PEG 8000
	Inkubationstemperatur:	18 °C
	Liganden:	D-Mannose (Soak) α -1,2-Mannobiose (Soak)
	Auflösungsgenauigkeit der Strukturen:	1,25 Ångström (Mannose)
		1,45 Ångström (Mannobiose)

Auch die Zugabe der Liganden D-Mannose und α -1,2-Mannobiose zu den Proteinkristallen, das Sammeln der Diffraktionsdaten, sowie die Lösung der Strukturen erfolgten durch Dr. Steuber. Die Bedingungen für die Kristallisation von Flo10A^{5SD} und die Auflösungsgenauigkeit der erhaltenen Strukturen sind in Tab. 2.8 zusammengefasst. In den Abb. 2.12a+b ist die calciumabhängige Bindung von D-Mannose und α -1,2-Mannobiose durch die chimäre Flo10A^{5SD}-Adhäsionsdomäne dargestellt. Bei der Bindung von D-Mannose durch Flo10A^{5SD} sind die gleichen Aminosäure-Seitenketten beteiligt wie bei Flo5A. Die Abstände zwischen D160 / D161 und D-Mannose sind bei beiden FloA-Domänen vergleichbar, während der Abstand zwischen Q98 und D-Mannose bei Flo10A^{5SD} um etwa 1 Å verkürzt ist, was u.a. ein Grund für die erhöhte Mannose-Affinität von Flo10A^{5SD} sein kann. Bei der Bindung von α -1,2-Mannobiose durch Flo10A^{5SD} sind ebenfalls die gleichen Aminosäure-Seitenketten beteiligt wie bei Flo5A. Beim Vergleich der Abstände zwischen dem Liganden und den jeweiligen FloA-Domänen stellte sich heraus, dass die Abstände zwischen Q117 und S227 zum zweiten Mannoserest vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu ist bei Flo10A^{5SD} der Abstand zwischen D160 und dem ersten Mannoserest um 0,5 Å, und zwischen Q98 und dem ersten Mannoserest um 0,7 Å erweitert (Abb. 2.12b, Abb. 1.8). Dies steht in Kontrast zu den Bindungsabständen welche für D-Mannose gemessen wurden (Abb. 2.12a). Darüber hinaus wurden eher geringere Abstände erwartet, da die Affinität von Flo10A^{5SD} gegenüber α -1,2-Mannobiose im Vergleich zu Flo5A fast 40-fache höher ist (Tab. 2.6). Dementsprechend konnte allein durch den Vergleich der Abstände zwischen Flo10A^{5SD} und den beiden Liganden D-Mannose und α -1,2-Mannobiose der Grund für die Affinitätssteigerung nicht eindeutig geklärt werden. Stattdessen wird vermutet, dass weitere Eigenschaften, wie beispielsweise die Wasserstruktur innerhalb der primären Bindetasche, eine Rolle spielen könnten.

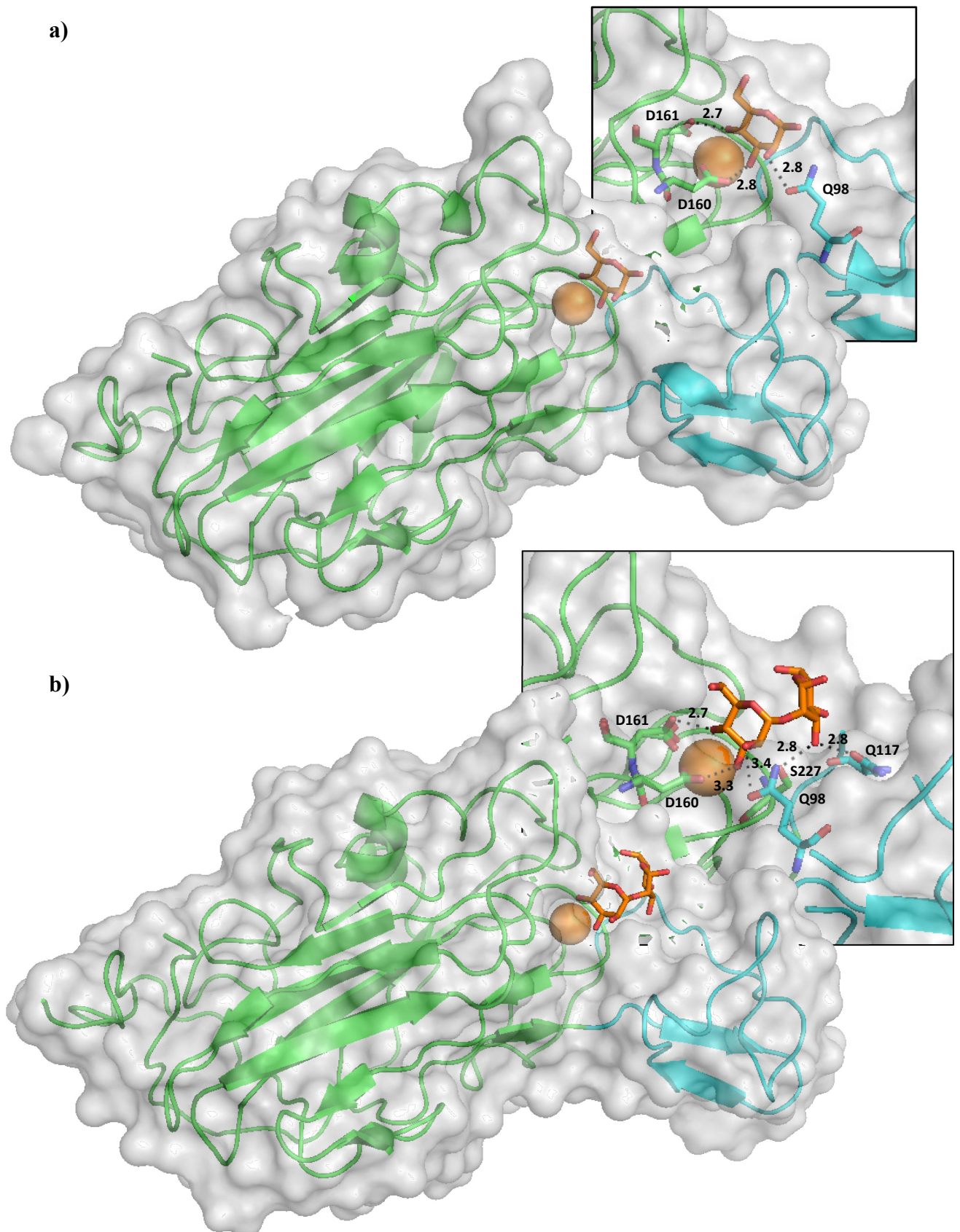


Abb. 2.12: Kristallstruktur der chimären Flo10A^{SSD}-Adhäsionsdomäne. (a) Zusammen mit gebundener D-Mannose. (b) Zusammen mit gebundener α -1,2-Mannobiose. Die Farbgebung erfolgte wie in Abb. 2.11. In der Detailansicht ist jeweils die Bindung von Mannose, bzw. von Mannobiose, durch Aminosäure-Seitenketten innerhalb der PA14-Domäne und der Subdomäne zu sehen.

2.4 Strukturelle und funktionelle Variabilität PA14-artiger FloA-Domänen aus *Saccharomyces*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft

2.4.1 Hintergrund zur Variabilitätsanalyse der FloA-Domänen

Da in dieser Arbeit mit Hilfe der chimären Flo5A^{10SD}- und Flo10A^{5SD}-Domänen bereits gezeigt werden konnte, dass Variationen innerhalb der FloA-Domänen zu funktionalen Unterschieden führen können, sollte in einem nächsten Schritt die natürlich vorkommende Variabilität der gesamten FloA-Domäne als auch der Subdomäne analysiert werden. Erste Hinweise darauf, dass es nicht nur innerhalb der zentralen Domäne mit ihren repetitive Sequenzmotiven zu Rekombinationsereignissen zwischen *FLO*-Genen kommt, sondern auch innerhalb der *FLOA*-Domänen, lieferte eine *in silico* durchgeführte Analyse von Christiaens *et al.* (2012). Diese Analyse weist u.a. auf Rekombinationsereignisse an homologen Sequenzabschnitten innerhalb des N- und C- terminalen Bereichs der *FLO*-Gene hin. Die daraus resultierenden, rekombinanten Flo-Proteine, weisen im Vergleich zu den parentalen Proteinen möglicherweise neue Adhäsionseigenschaften auf, was von Christiaens *et al.* bereits ansatzweise anhand von Flo1, Flo10, und Flo11 gezeigt werden konnte. Eine detaillierte Analyse zur Variabilität der FloA-Domäne und den daraus resultierenden funktionalen Unterschieden wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Daher sollte in dieser Arbeit neben der Variabilitätsanalyse der PA14-artigen FloA-Domänen, mit Hilfe von Sequenzvergleichen und einer phylogenetischen Analyse, auch ein erster Einblick gewonnen werden, inwiefern die Variabilität zu funktionalen Unterschieden *in vivo* führt. Dazu wurden einige *FLOA*-Domänen ausgewählt, und in einem einheitlichen Expressionssystem (Abschnitt 2.1.1) auf ihre Zell-Zell- und Agar-Adhäsion hin überprüft (Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3). Die Ergebnisse aus den *in vivo*-Tests sollten anschließend auch mit der Herkunft der *Saccharomyces*-Stämme verglichen werden, aus welchen die *FLOA*-Domänen zuvor isoliert worden waren. Dadurch sollte eine eventuelle Korrelation zwischen bestimmten ökologischen Nischen und den darin benötigten Adhäsionseigenschaften abgeleitet werden.

Die *Saccharomyces*-Stämme welche verwendet wurden waren teilweise bereits veröffentlicht worden, oder wurden von verschiedenen Institutionen bezogen (Tab. 4.13). Insgesamt konnten dadurch 53 Stämme gesammelt werden welche aus der Wein- und Brauereiindustrie stammen, oder welche zuvor aus Lebensmitteln, bzw. klinischen Proben, isoliert worden waren (Tab. 2.9, Tab. 4.13). Bei diesen Stämmen handelt es sich jedoch nicht zwangsläufig, wie bei den Laborstämmen, um haploide, sondern vermutlich um diploide oder polyploide

Tab. 2.9: Verwendeten Abkürzungen zur Beschreibung der *Saccharomyces*-Stammherkunft. Darüber hinaus ist die Anzahl der Stämme aus den jeweiligen Herkunftsquellen angegeben.

Herkunft des Stammes	Abkürzung	Anzahl Stämme
Wein	Wn	27
Klinisch	Kl	17
Brauerei	Br	6
Probiotisch	Pro	3

Saccharomyces-Stämme. Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden zum Teil im Rahmen einer von mir betreuten Bachelor- (Johanna Müller) und Masterarbeit (Eva Ackermann) durchgeführt.

2.4.2 Isolierung und bioinformatische Analyse der FloA-Domänen

2.4.2.1 Isolierung und Sequenzierung

Um die *FLOA*-Domänen aus dem Genom der verschiedenen *Saccharomyces*-Stämme isolieren zu können, wurde für jede Domäne ein Primer-Paar erstellt und diese über PCR amplifiziert. Ein Primer bindet dabei im jeweiligen Promotor und der andere kurz nach der *FLOA*-Domäne. Für die Festlegung der Primer-Bindestellen wurden bereits veröffentlichte Genomsequenzen von *S. cerevisiae*-Stämmen verwendet, um übereinstimmende Sequenzabschnitte zu identifizieren wo die Primer jeweils binden sollten (Tab. 2.10). Die PCR-Produkte, welche glatte Enden enthielten, wurden dann in die multiple Klonierungsstelle (engl. MCS) des Suizidvektors pJET1.2 inseriert, welcher zuvor mit *EcoRV* verdaut worden war. In diesem fand auch die Sequenzierung mit Hilfe der Primer pJET1.2_seq_fw. und pJET1.2_seq_rev. (Tab. 4.10) statt, welche vor und nach der MCS binden. Insgesamt konnten dadurch 48 vollständige *FLO1A*-, 37 *FLO5A*-, 50 *FLO9A*-, und 19 *FLO10A*-Domänen isoliert und sequenziert werden. Darüber hinaus wurden auch Pseudogen-Sequenzen isoliert, welche Rasterverschiebungen enthielten. Die Benennung der Domänen nach ihrem Flo-Typ fand

Tab. 2.10: *S. cerevisiae*-Stämme, deren Genomsequenzen bei der Wahl der Primer-Bindestellen verwendet wurden. Dabei dienten Sequenzabschnitte mit hoher Übereinstimmung im Promotor und kurz nach der *FLOA*-Domäne der Auswahl der Primersequenzen.

<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	Stamm-Hintergrund	Referenz
Σ1278b	Laborstamm	Dowell <i>et al.</i> , 2010
S288c	Laborstamm	Goffeau <i>et al.</i> , 1996
CLIB215	Bäckerei-Isolat, Neuseeland	Saccharomyces Genome Database, 2011
CLIB324	Bäckerei-Isolat, Vietnam	Saccharomyces Genome Database, 2011
Kyokai no.7	Sake Herstellung, Japan	Akao <i>et al.</i> , 2011
Y10	Kokosnuss-Isolat, Philippinen	Saccharomyces Genome Database, 2011

anschließend auf Proteinebene mit Hilfe der Signalsequenz statt. Ebenso wurden alle nachfolgenden Analysen mit Hilfe der Proteinsequenzen durchgeführt.

2.4.2.2 Phylogenetische Analyse

Zunächst sollte ein Überblick über den Verwandtschaftsgrad zwischen den verschiedenen FloA-Domänen erstellt werden. Dazu wurden die Proteinsequenzen der isolierten Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen zusammen mit den Referenzdomänen aus den *S. cerevisiae*-Laborstämmen Σ1278b und S288c phylogenetisch mit Hilfe des Programms SeaView (Gouy *et al.*, 2010) analysiert. Die Darstellung erfolgte durch das Programm Dendroscope (Huson *et al.*, 2007). Es wurden zwei phylogenetische Bäume erstellt. Von diesen enthält einer die FloA-Domänen zusammen mit deren jeweiliger Signalsequenz, während der andere nur die FloA-Domänen beinhaltet.

Unter Einbezug der Signalsequenz ist eine Gruppierung der FloA-Domänen nach ihrem Flo-Typ zu beobachten (Abb. 2.13). Da die Flo10A-Domänen nahezu invariabel waren wurden nur solche Sequenzen in die Analyse miteinbezogen, welche sich voneinander unterscheiden. Die Domäne Flo5A_{Br6} weist insbesondere im Bereich nach der Subdomäne eine hohe

$\text{---}0.01$



Abb. 2.13: Phylogenetischer Baum der FloA-Domänen, zusammen mit deren jeweiliger Signalsequenz. Dargestellt ist ein ungewurzelter Baum, welcher den Verwandtschaftsgrad zwischen den einzelnen FloA-Domänen zusammen mit deren Signalsequenz aufzeigt. Es zeigt sich eine klare Gruppierung der Domänen nach ihrem Flo-Typ.

Letztendlich führten die Ergebnisse aus der phylogenetischen Analyse zu der Erkenntnis, dass die Einteilung der FloA-Domänen in verschiedene Flo-Typen mit Hilfe der Signalsequenz größtenteils, aber nicht immer zutreffend ist. Die Ursache dafür könnten die bereits erwähnten möglichen Rekombinationsereignisse innerhalb der *FLOA*-Domänen zwischen verschiedenen *FLO*-Genen sein, wie von Christiaens *et al.* (2012) angedeutet. Dies findet bei den *FLO1A*-, *FLO5A*-, und *FLO9A*-Domänen in allen möglichen Kombinationen statt. *FLO10A* stellt dagegen eine nahezu vollständig in sich geschlossene Verwandtschaftsgruppe dar.

2.4.2.3 Die sequentielle Variabilität der Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen

Nach der phylogenetischen Analyse der isolierten PA14-artigen FloA-Domänen wurden diese in einem Sequenzvergleich detailliert miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte dabei der Übersicht halber zwischen den Domänen eines Flo-Typs, unter Verwendung des Programms Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007). Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms Jalview (www.jalview.org). Dabei wurden hoch konservierte Sequenzbereiche Blau hervorgehoben, während konservierte Bereiche Hellblau, und schwach konservierte Bereiche Weiß markiert sind.

Für Flo1A ergab der sequenzielle Vergleich nach einer groben Einteilung drei Gruppen verschiedener Flo1-Adhäsionsdomänen, sowie eine individuelle Sequenz (Abb. 2.15). In keiner dieser Gruppen sind die Referenzsequenzen aus den *S. cerevisiae*-Laborstämmen Σ 1278b und S288c enthalten. Die meisten Sequenzunterschiede wurden innerhalb der Subdomäne, bzw. innerhalb der PA14-Domäne nach der Subdomäne gefunden. Auffällig war, dass in allen Flo1A-Domänen einige der Sequenzabweichungen an derselben Aminosäureposition lokalisiert waren. An diesen Positionen wurden bis zu drei verschiedene Aminosäuren gefunden. Positionsbezogene Variationen wurden allerdings nicht nur innerhalb der Flo1A-Domänen, sondern auch für die Flo5- und Flo9A-Domänen gefunden (Abb. 2.16 und Abb. 2.17).

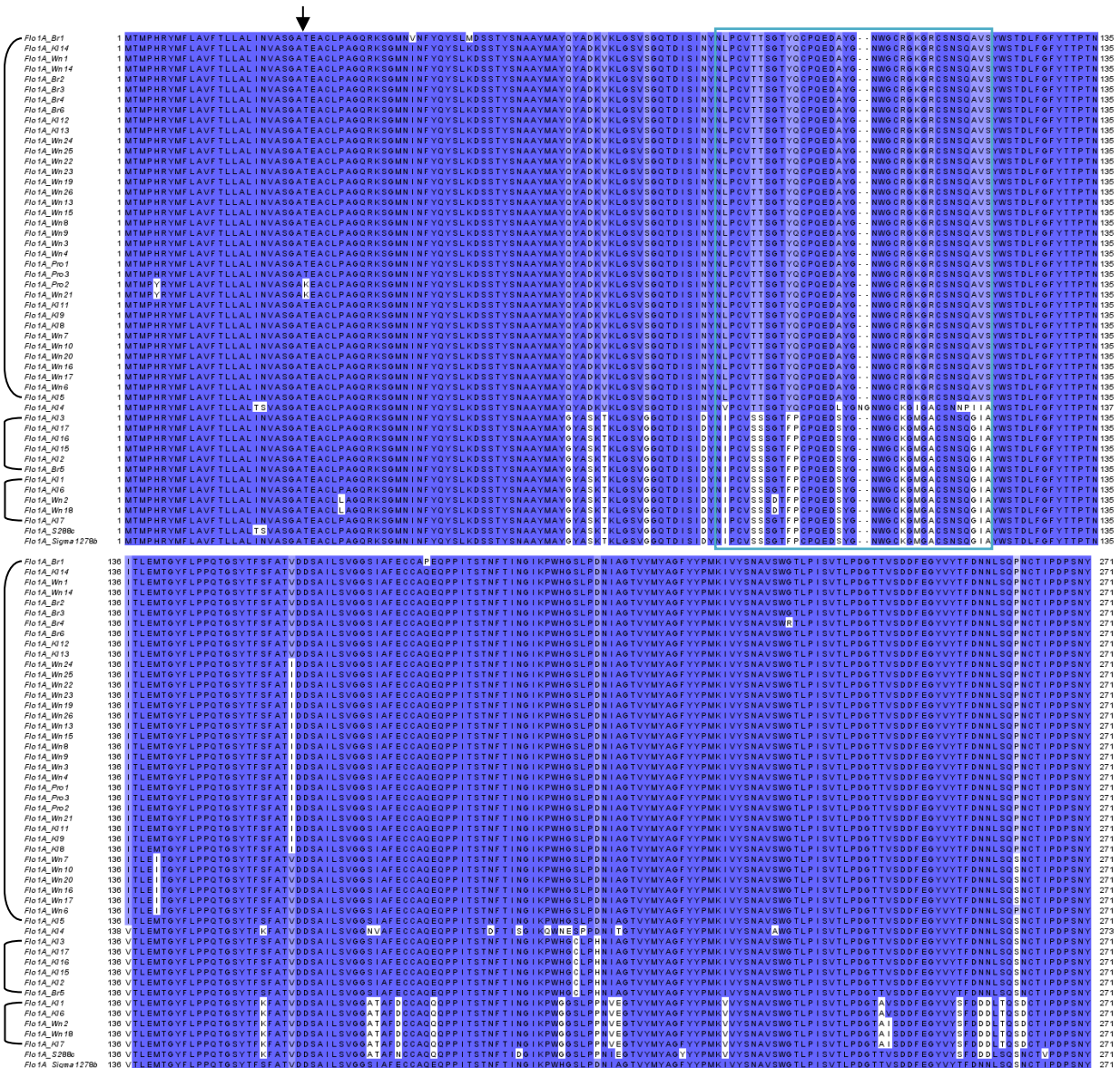


Abb. 2.15: Sequenzieller Vergleich der Flo1-Adhäsionsdomänen. Der Vergleich aller isolierten Flo1A-Domänen ergab drei Hauptgruppen sowie eine einzelne, individuelle Sequenz. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der Adhäsionsdomäne nach der Signalsequenz an. Die blaue Umrandung markiert den Bereich der Subdomäne.

Im Vergleich zu den Flo1-Adhäsionsdomänen erwiesen sich die Flo5A-Domänen als deutlich variabler (Abb. 2.16). Hier wurden sieben Gruppen von Flo5-Adhäsionsdomänen, sowie zwei individuelle Sequenzen gefunden. Eine der Gruppen enthält die Referenzsequenz aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c, welche in beiden Stämmen identisch ist. Neben Variationen innerhalb der flankierenden PA14-Domäne wurden Subdomänen gefunden, die in ihrer Sequenz deutlich voneinander abweichen. Aus dem *S. cerevisiae*-Stamm K117 wurden zudem zwei Flo5A-Allele isoliert, was durch die Nummerierung kenntlich gemacht wurde.

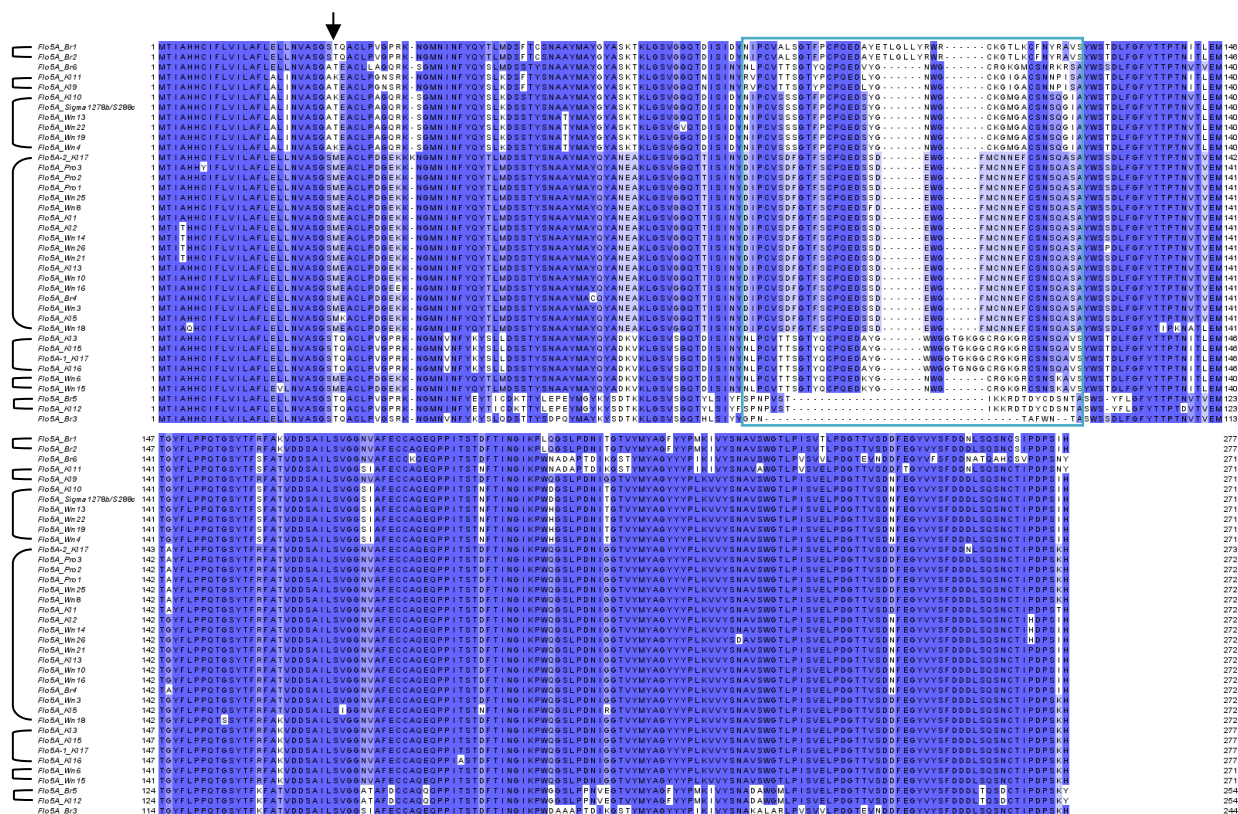


Abb. 2.16: Sequenzieller Vergleich der Flo5-Adhäsionsdomänen. Aus allen isolierten Sequenzen konnten sieben Gruppen, sowie einzelne individuelle Sequenzen identifiziert werden. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der Adhäsionsdomäne nach der Signalsequenz an. Die blaue Umrandung gibt den Bereich der Subdomäne an.

Die Variabilität der Flo9A-Domänen verhielt sich in etwa gleich wie die der Flo1A-Domänen (Abb. 2.17). Auch hier wurden drei Gruppen von Flo9-Adhäsionsdomänen identifiziert, sowie zwei individuelle Sequenzen. Zwei Gruppen enthalten jeweils eine der Referenzsequenzen aus den *S. cerevisiae*-Laborstämmen Σ 1278b und S288c. Allerdings wurden für Flo9A die meisten Differenzen innerhalb der PA14-Domäne gefunden welche auf die Subdomäne folgt. Die Subdomänen selbst erwiesen sich, bezogen auf die gesamte Adhäsionsdomäne, als wenig variabel.

Darüber hinaus wurden aber auch Sequenzen isoliert, welche zwar die Signalsequenz von Flo10 beinhalten, die darauf folgende Sequenz jedoch nicht mit der Adhäsionsdomäne von Flo10 vergleichbar ist (Abb. 2.19). Zudem endet diese Sequenz vorzeitig durch ein Stopcodon. Interessanterweise wurden aus einem Teil der Stämme jedoch sowohl eine vollständige als auch die deletierte Version von Flo10A isoliert, was anhand der Sterne in den Abb. 2.18 und Abb. 2.19 angedeutet ist.

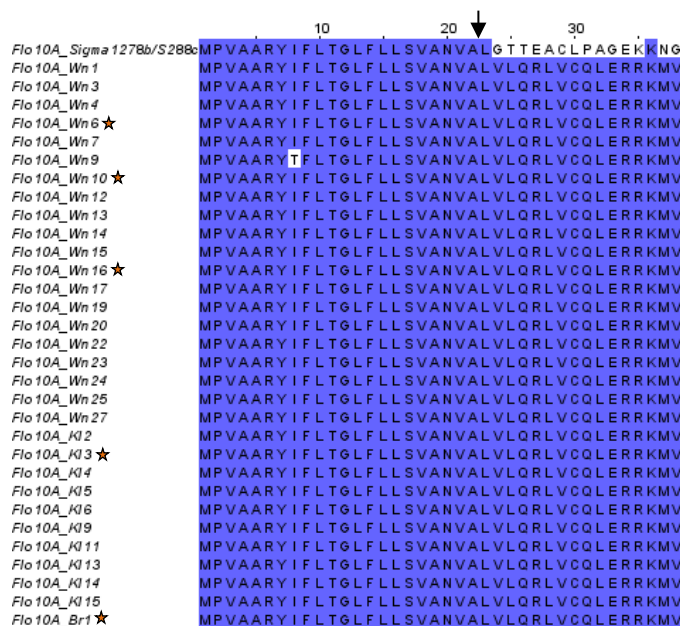


Abb. 2.19: Sequenzieller Vergleich der Flo10A-Domänen, welche ein vorzeitiges Stopcodon enthalten. Dabei endeten alle Sequenzen an der gleichen Aminosäure unmittelbar nach der Signalsequenz, deren Ende durch den Pfeil angegeben ist. Aus den mit Sternen markierten Stämmen wurden aber auch vollständige Flo10A-Domänen isoliert.

Insgesamt konnte durch den Vergleich der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Proteinsequenzen untereinander eine hohe Variabilität innerhalb der Flo5A-Domänen nachgewiesen werden. Die Flo1A- und Flo9A-Domänen waren vergleichsweise weniger variabel. Flo10A erwies sich dagegen als hoch konservierte FloA-Domäne. Von allen FloA-Domänen konnten zudem Pseudogen-Sequenzen isoliert werden. Bei Flo1A, Flo5A, und Flo9A enthielten die entsprechenden Sequenzen Rasterverschiebungen (nicht gezeigt), während für Flo10A nur eine Variante isoliert wurde welche bis auf die Signalsequenz jedoch nicht mit Flo10A vergleichbar ist (Abb. 2.19).

2.4.3 Funktionale Analyse mit Hilfe von ausgewählten FloA-Domänen

2.4.3.1 Vergleich der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Subdomänen und Auswahl der FloA-Domänen

Nachdem bereits am Beispiel von Flo5A und Flo10A aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c gezeigt werden konnte, dass die Funktionalität und Ligandenspezifität dieser FloA-Domänen abhängig von der jeweiligen Subdomäne ist (Abschnitt 2.2), wurde die Analyse der Subdomäne mit Hilfe der gewonnenen FloA-Sequenzen ausgeweitet. Dies erfolgte, indem aus allen Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Proteinsequenzen die Subdomänen isoliert und miteinander verglichen wurden. Dadurch konnten aus insgesamt 135 Sequenzen 21 Subdomänentypen identifiziert werden (Abb. 2.20a + b). Die meisten davon sind in Gruppen, bestehend aus zwei oder mehr identischen Sequenzen, zusammengefasst. Es wurden aber auch einzelne, individuelle Subdomänen gefunden. Interessanterweise sind die Subdomänentypen nicht immer nach dem FloA-Typ voneinander getrennt, was zum Beispiel anhand der Subdomänentypen 2, 13 und 14 zu sehen ist. Hier befinden sich Subdomänen, welche in Flo1A-Domänen gefunden wurden, in einer Gruppe mit Subdomänen aus Flo5A- oder Flo9A-Domänen. Von den Referenzsequenzen aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c gliedern sich diese bis auf Flo9A_{S288c} in Gruppen ein, wobei die Subdomänen beider Flo1A- und Flo5A-Domänen identisch sind und sich demnach in der gleichen Gruppe befinden (Abb. 2.20a). Nach dem sequentiellen Vergleich und der Einordnung der Subdomänen in verschiedene Typen sollte als nächstes in einem Flokkulations- und Agar-Adhäsionstest deren jeweilige *in vivo*-Funktion in Kombination mit ihrer ursprünglichen PA14-Domäne überprüft werden. Dazu wurde aus 11 Subdomänentypen mindestens eine repräsentative Adhäsionsdomäne ausgewählt und diese in den Hefe-Expressionsvektor BHUM2157 (Abb. 2.1), wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, inseriert. Die jeweils gewählten FloA-Domänen sind in Abb. 2.20a + b mit einem schwarzen Punkt markiert. Darüber hinaus wurden die Adhäsionsdomänen so gewählt, dass sie exemplarisch für den *S. cerevisiae*-Stamm K12 eine Übersicht über die *in vivo*-Funktion seiner Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domäne ergaben. Dies sollte auch für die *S. cerevisiae*-Stämme Wn14 und Br1 erfolgen, was jedoch bis zum Abschluss des Projekts nicht durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über eine eventuelle funktionale Spezialisierung einzelner FloA-Domänen, bzw. über funktionale Überschneidungen innerhalb eines Stammes geben, so wie dies bereits in den verwendeten Laborstämmen nachgewiesen wurde (Abschnitt 2.1).

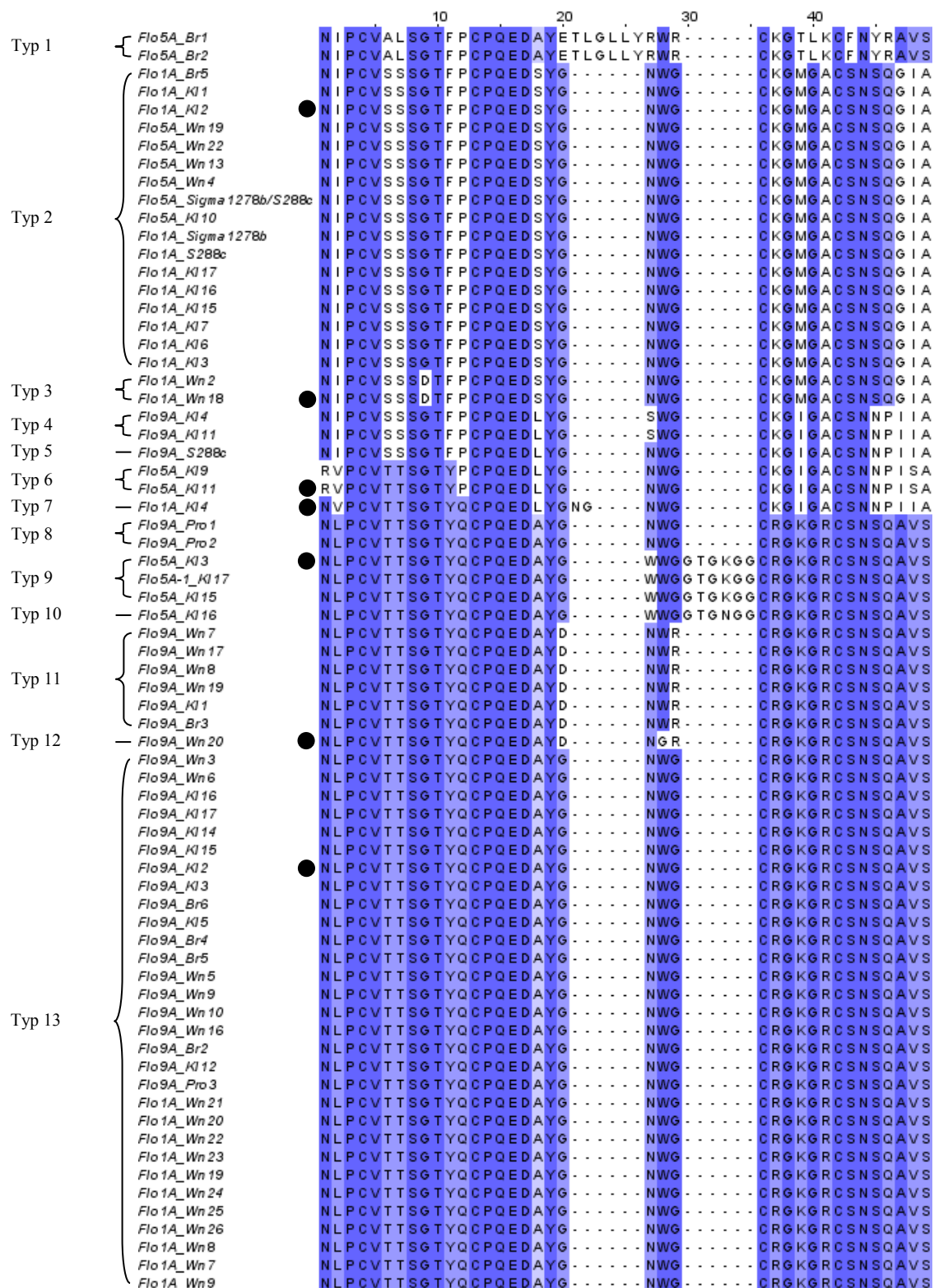


Abb. 2.20a: Sequenzieller Vergleich der Subdomänen von Flo1A, Flo5A, und Flo9A aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen untereinander und mit den Laborstämmen Σ 1278b und S288c. Die schwarzen Punkte markieren jeweils Adhäsionsdomänen, deren adhäsive Eigenschaften anschließend in einem Flokkulations- und Agar-Adhäsionstest weiter charakterisiert wurden.

Typ 13	Flo1A_Wn6	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn10	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn4	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn13	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn14	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn15	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn16	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Pro2	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Pro1	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Pro3	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn17	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Br4	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Br3	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Wn1	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Br2	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Br1	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K14	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K13	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K12	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K11	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
Typ 14	Flo1A_K9	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K8	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_Br6	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo1A_K5	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
	Flo9A_K13	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn2	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Sigma1278b	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn1	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn4	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn26	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn11	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn21	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn12	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn18	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn13	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn22	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn15	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn23	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Flo9A_Wn24	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
	Typ 15	Flo9A_Wn25	NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS
Flo5A_Wn15		NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
Flo5A_Wn6		NLPCVTTTSGTYQCPQEDKYGNWG	CRGKGRCNSNSKAVS	
Flo9A_K16		NLPCVTTTSGTYQCPQEDVYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
Typ 16	Flo9A_K10	NLPCVTTTSGTYQCPQEDVYGNWG	CRGKGRCNSNSQAVS	
Typ 17	Flo9A_K7	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQASA	
Typ 18	Flo9A_K8	NLPCVTTTSGTYQCPQEDAYGNWG	CRGKGRCNSNSQASA	
Typ 19	Flo5A_Br6	NLPCVTTTSGTYQCPQEDVYGNWG	CRGKGRCNSNSQASA	
	Flo9A_Br1	NLPCVTTTSGTYQCPQEDVYGNWG	CRGKGRCNSNSQASA	
	Flo5A_Wn25	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn26	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn21	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn18	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn16	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn14	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn10	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Wn3	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Pro3	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Pro2	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Pro1	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A-2_K17	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_K13	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_K15	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_K11	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Flo5A_Br4	DIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA	
	Typ 20	Flo5A_Wn8	DIPCVSDFGTFSCPQEDSFDEWG	FMCNNE-FCSNSQASA
	Typ 21	Flo5A_Br5SPNPFVSTIKK	RD TDYCD SNTA
Flo5A_K12	SPNPFVSTIKK	RD TDYCD SNTA	

Abb. 2.20b: Fortsetzung von Abb. 2.20a.

2.4.3.2 Sequentieller Vergleich der gewählten FloA-Domänen

Die Proteinsequenzen der für die funktionale Analyse ausgewählten FloA-Domänen wurden in Abb. 2.21a+b, zusammen mit den Referenzdomänen, nochmal miteinander verglichen. Die Subdomäne ist blau, und die für die Bindung von Mannobiose benötigten Aminosäuren schwarz umrandet.

Flo5A_KJ3	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGS	60
Flo5A_Wn15	1	MTIAHHCIFLVILAFLEVLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNINFYQYTLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo5A_Wn14	1	MTITHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNINFYQYTLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo5A_KJ2	1	MTITHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNINFYQYTLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo5A_Pro2	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNINFYQYTLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_Br1	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_Wn17	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_KJ4	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALTSVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo9A_KJ2	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFIYQYSLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo9A_Wn20	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFIYQYSLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo9A_Br1	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFIYQYSLMDSSSTYSNAAAYM	60
Flo9A_S288c	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLTNNVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFIYQYSLRDSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_KJ2	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_Sigma1278b	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo1A_Wn18	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFIYQYSLKDSSTYSNAAAYM	60
Flo5A_Sigma1278b/S288c	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGAKGACLPAGNRKNGMNVNFIYQYSLKDSFTYSNAAAYM	60
Flo5A_KJ11	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGAKGACLPAGNRKNGMNVNFIYQYSLKDSFTYSNAAAYM	60
Flo5A_Br3	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSSTQACLPVGSRKNGMNVNFIYKYSLQDSTTYSDPQYIM	60
Flo5A_KJ3	61	AYQYADKVKLGVS	118
Flo5A_Wn15	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo5A_Wn14	61	AYQYANEAKLGVS	113
Flo5A_KJ2	61	AYQYANEAKLGVS	113
Flo5A_Pro2	61	AYQYANEAKLGVS	113
Flo1A_Br1	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo1A_Wn17	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo1A_KJ4	61	AYQYADKVKLGVS	114
Flo9A_KJ2	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo9A_Wn20	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo9A_Br1	61	AYQYADKVKLGVS	112
Flo9A_S288c	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo1A_KJ2	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo1A_Sigma1278b	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo1A_Wn18	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo5A_Sigma1278b/S288c	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo5A_KJ11	61	AYGYASKTKLGVS	112
Flo5A_Br3	61	AYKYSDTKLGVS	91
Flo5A_KJ3	119	CSNSQAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	178
Flo5A_Wn15	113	CSNSKAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo5A_Wn14	114	CSNSQASAYWSSDLFGFYTTPTNVT	173
Flo5A_KJ2	114	CSNSQASAYWSSDLFGFYTTPTNVT	173
Flo5A_Pro2	114	CSNSQASAYWSSDLFGFYTTPTNVT	173
Flo1A_Br1	113	CSNSQAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo1A_Wn17	113	CSNSQAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo1A_KJ4	115	CSNNPIIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	174
Flo9A_KJ2	113	CSNSQAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo9A_Wn20	113	CSNSQAVSYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo9A_Br1	113	CSNSQASAYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo9A_S288c	113	CSNNPIIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	172
Flo1A_KJ2	113	CSNSQGIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	172
Flo1A_Sigma1278b	113	CSNSQGIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	172
Flo1A_Wn18	113	CSNSQGIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	172
Flo5A_Sigma1278b/S288c	113	CSNSQGIAYWSTDLFGFYTTPTNVT	172
Flo5A_KJ11	113	CSNNPIIAYWSTDLFGFYTTPTNI	172
Flo5A_Br3	92	TSWSSDLFGFYTTPTNVT	145

Abb. 2.21a: Sequenzieller Vergleich zwischen den getesteten FloA-Domänen und den Referenzdomänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der FloA-Domänen nach der Signalsequenz an. Die blaue Umrandung gibt den Bereich der Subdomäne an. Darüber hinaus sind diejenigen Aminosäuren schwarz umrandet, für welche bei der Flo5A-Domäne eine Beteiligung an der Ligandenbindung nachgewiesen wurde.

<i>Flo5A_KJ3</i>	179	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPWQGS	LPDNI	GGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	238	
<i>Flo5A_Wn15</i>	173	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPWQGS	LPDNI	GGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo5A_Wn14</i>	174	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPWQGS	LPDNI	GGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	233	
<i>Flo5A_KJ2</i>	174	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPWQGS	LPDNI	GGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	233	
<i>Flo5A_Pro2</i>	174	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPWQGS	LPDNI	GGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	233	
<i>Flo1A_Br1</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo1A_Wn17</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo1A_KJ4</i>	175	FECCAQEPPITST	DFTISG	IKQWNE	SPDNI	TGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	234
<i>Flo9A_KJ2</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo9A_Wn20</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo9A_Br1</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo9A_S288c</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWNG	SPDNI	TGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo1A_KJ2</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	CLPHNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo1A_Sigma1278b</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWHG	SLPDNI	AGTVYMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo1A_Wn18</i>	173	FDCCAQQPPITST	NFTINGIKPWGGS	LPNVE	GTVMYAG	FYPMK	IVYSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo5A_Sigma1278b/S288c</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPWGGS	LPDNI	TGTVYMYAG	YYPL	LKVVSNAV	SWG	TLP	232	
<i>Flo5A_KJ11</i>	173	FECCAQEPPITST	NFTINGIKPW	NADAP	TDIK	GSTYMYAG	YYPI	IKIVYSNAV	SWG	TLP	232
<i>Flo5A_Br3</i>	146	FECCAQEPPITST	DFTINGIKPW	DAAAR	TDIK	GSTYMYAG	YYPI	IKIVYSNAK	ALARP	205	

<i>Flo5A_KJ3</i>	239	ISVELPDGTTVSD	DFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IPDPS	KH			277
<i>Flo5A_Wn15</i>	233	ISVELPDGTTVSD	DFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IPDPS	KH			271
<i>Flo5A_Wn14</i>	234	ISVELPDGTTVSD	NFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IHDPS	IH			272
<i>Flo5A_KJ2</i>	234	ISVELPDGTTVSD	NFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IHDPS	IH			272
<i>Flo5A_Pro2</i>	234	ISVELPDGTTVSD	DFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IPDPS	KH			272
<i>Flo1A_Br1</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	PNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo1A_Wn17</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	SNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo1A_KJ4</i>	235	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	SNCT	IPDPS	NY			273
<i>Flo9A_KJ2</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	PNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo9A_Wn20</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	SNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo9A_Br1</i>	233	ISVTLPEGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	PNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo9A_S288c</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	PNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo1A_KJ2</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	SNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo1A_Sigma1278b</i>	233	ISVTLPDGTTVSD	DFEGYVYT	FDNNLSQ	SNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo1A_Wn18</i>	233	ISVTLPDGTAIS	DDFEGYVYS	FDDDL	TQSDCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo5A_Sigma1278b/S288c</i>	233	ISVELPDGTTVSD	NFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IPDPS	IH			271
<i>Flo5A_KJ11</i>	233	VSVELPDGTTVSD	FTGYVYS	FDDNL	LSQSNCT	IPDPS	NY			271
<i>Flo5A_Br3</i>	206	VSVVLPDGT	EVNDDFEGYVYS	FDDDL	LSQSNCT	IPDPS	KH			244

Abb. 2.21b: Fortsetzung von Abb. 2.21a.

Dabei erwies sich das DcisD-Motiv als vollständig invariabel. Auch Q98 zu Beginn der Subdomäne ist nahezu invariabel. Q117 und S227 sind dagegen teilweise variabel. Daneben unterscheiden sich die einzelnen FloA-Domänen nicht nur in ihrer Subdomäne, sondern auch in ihrer PA14-Domäne voneinander.

2.4.3.3 Expression der FloA-Domänen

Nachdem die Gensequenzen der zu testenden FloA-Domänen in den Hefe-Expressionsvektor inseriert worden waren, wurde zunächst mit Hilfe des HA-Tags die Anwesenheit der Flokkuline in der Zellwand von *S. cerevisiae* fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Tab. 2.11, Abb. 2.22).

Tab. 2.11: Konstrukte, welche für die funktionale Charakterisierung von FloA-Domänen mit unterschiedlichen Subdomänen verwendet wurden.

Konstrukt	Bezeichnung in der Stammsammlung
Leervektor	B2445
<i>FLOA-Δ-FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2157
<i>FLO11A_{Σ1278b}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2158
<i>FLO1A_{Σ1278b}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2298
<i>FLO5A_{Σ1278/S288c}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2295
<i>FLO9A_{S288c}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2716
<i>FLO1A_{Wn17}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2701
<i>FLO1A_{Wn18}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2704
<i>FLO1A_{K12}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2702
<i>FLO1A_{K14}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2703
<i>FLO1A_{Br1}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2705
<i>FLO5A_{Wn14}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2706
<i>FLO5A_{Wn15}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2710
<i>FLO5A_{K12}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2709
<i>FLO5A_{K13}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2711
<i>FLO5A_{K111}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2712
<i>FLO5A_{Br3}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2708
<i>FLO5A_{Pro2}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2707
<i>FLO9A_{Wn20}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2714
<i>FLO9A_{K12}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2713
<i>FLO9A_{Br1}- FLO11BC_{Σ1278b}</i>	BHUM2715

Dabei konnten alle FloA-Domänen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen dienten, wie bereits zuvor in den Abschnitten 2.1 und 2.2. beschrieben, ein Leervektor ohne Flokkulin-Gen sowie ein Vektor, in dem die FloA-Domäne deletiert worden war (FloA-Δ). Als Referenz für den anschließenden Flokkulations- und Agar-Adhäsionstest wurden die Flo1A_{Σ1278b}-, die Flo5A_{Σ1278b/S288c}-, und die Flo9A_{S288c}-Domänen verwendet.

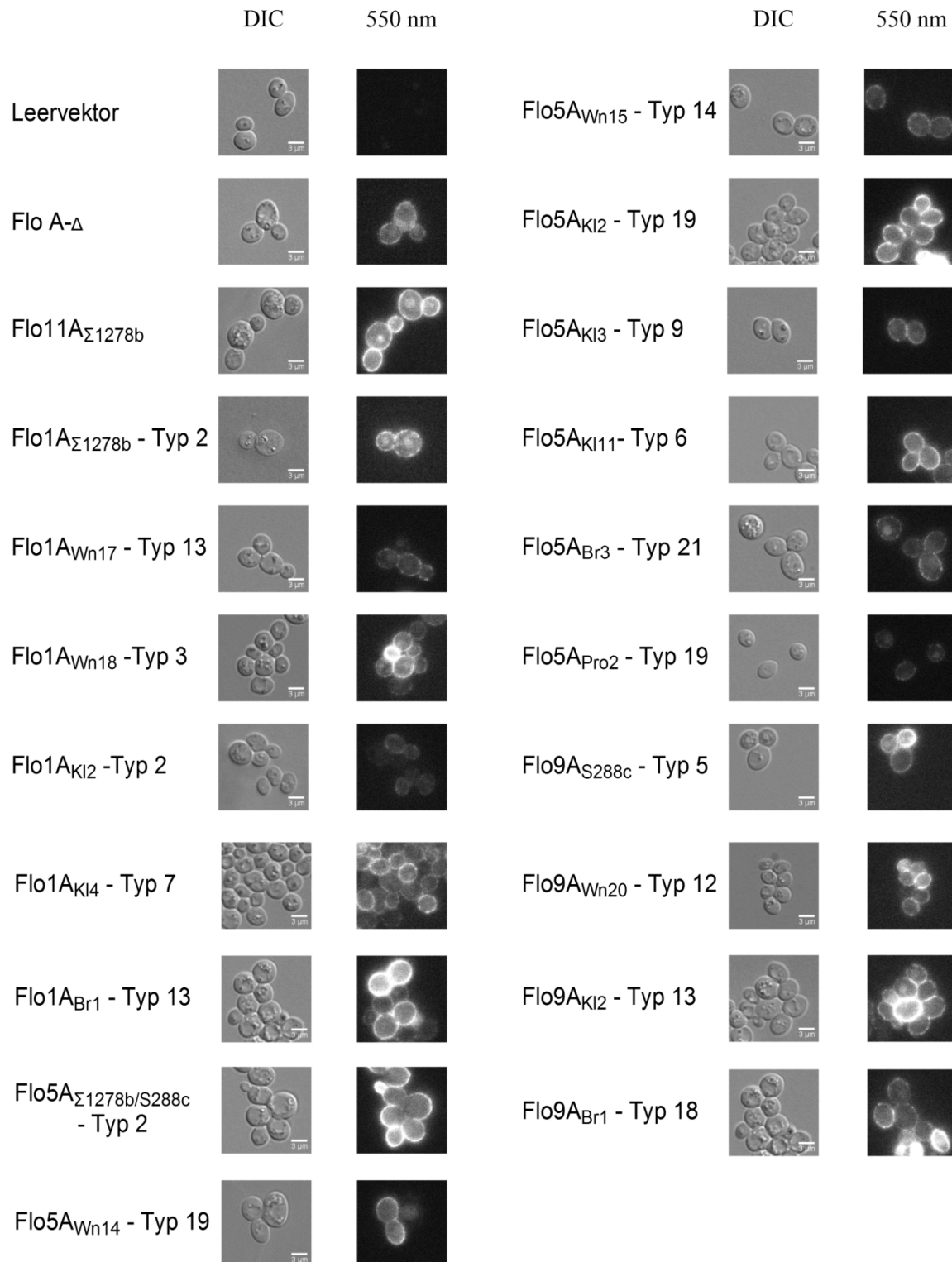


Abb. 2.22: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FloA-Domänen mit verschiedenen Subdomänen auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae*. Der Leervektor, sowie der Vektor ohne FloA-Domäne (FloA-Δ), dienen für die anschließenden *in vivo*-Tests jeweils als Negativkontrolle. Da der Leervektor kein HA-Taq enthält wurde hier keine Fluoreszenz erwartet. Für die Referenzdomänen Flo1A_{Σ1278b}, Flo5A_{Σ1278b/S288c}, und Flo9A_{S288c}, sowie für alle zu testenden FloA-Domänen konnte deren Anwesenheit in der Zellwand nachgewiesen werden. Zusätzlich ist der Subdomärentyp, welcher in der jeweiligen FloA-Domäne enthalten ist, angegeben. Der Größenstandard gibt 3 μm an.

2.4.3.4 Messung des Flokkulationsvermögens repräsentativer FloA-Domänen eines Subdomänentyps

Die Messung der Zell-Zell Adhäsion erfolgte so, wie sie bereits in Abschnitt 2.1.2 beschrieben ist. Der Flokkulationstest wurde zweimal an jeweils verschiedenen Tagen durchgeführt. Die angegebenen Flokkulationsraten stellen für die Tests mit Flo1A- und Flo9A-Domänen den Mittelwert aus mindestens sechs einzelnen Messwerten, und für die Flo5A-Domänen den Mittelwert aus mindestens fünf einzelnen Messwerten dar. Dazu sind die jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Von den getesteten Flo1A-Domänen konnte für die Domänen welche aus klinischen Isolaten stammten Flokkulation nachgewiesen werden (Abb. 2.23). Darüber hinaus konnte die

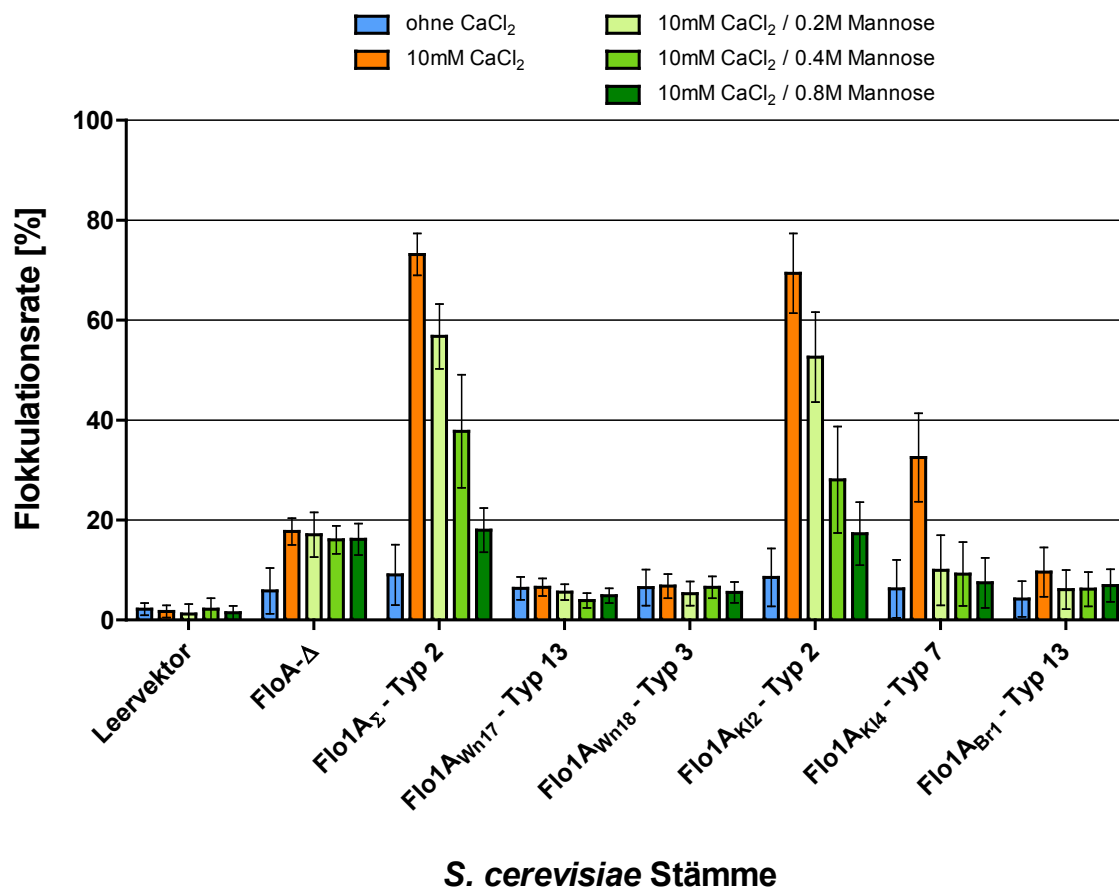


Abb. 2.23: Flokkulationstest zur Überprüfung der Zell-Zell Adhäsion verschiedener Flo1A-Domänen. Das Flokkulationsverhalten von Flo1A_{K12} gleicht dem der Referenzdomäne Flo1A_{Σ1278b}. Flo1A_{K14} weist dagegen eine deutlich schwächere Zell-Zell Adhäsion auf, welche bereits durch relativ geringe Konzentrationen an freier Mannose inhibierbar ist. Für die Domänen Flo1A_{Wn17}, Flo1A_{Wn18} und Flo1A_{Br1} konnte keine Flokkulation nachgewiesen werden. Für jede Domäne ist zusätzlich der jeweilige Subdomänentyp angegeben.

Zell-Zell Adhäsion dieser beiden Flo1A-Domänen durch Zugabe von Mannose inhibiert werden. Die Flo1A_{K12}-Domäne verhielt sich von ihrer Flokkulationsrate und ihrer Mannose-Inhibierbarkeit her nahezu gleich zur Referenzdomäne Flo1A_{Σ1278b}. Da beide FloA-Domänen die gleiche Subdomäne enthalten, und sich darüber hinaus in ihrer PA14-Domäne an nur zwei Aminosäurepositionen voneinander unterscheiden (Abb. 2.21a+b), wurde ein ähnliches Flokkulationsverhalten zwischen beiden erwartet. Die Zell-Zell Adhäsion von Flo1A_{K14} fiel dagegen deutlich schwächer aus und konnte bereits durch Zugabe von 0,2 M Mannose vollständig inhibiert werden. Flo1A_{K14} weicht insgesamt sequentiell von der Referenzdomäne Flo1A_{Σ1278b} ab, wovon u.a. auch die an der Bindung von Mannobiose beteiligten Aminosäuren an den Positionen 117 und 227 betroffen sind (Abb. 2.21a+b). In Flo1A_{K14} befindet sich an diesen Positionen ein Prolin, bzw. ein Alanin, statt wie in Flo1A_{Σ1278b} ein Glutamin und ein Serin. Da für Flo1A_{K14} dennoch Flokkulation nachgewiesen werden konnte bestätigt dies, wie schon in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, dass die an der Bindung von Mannobiose beteiligten Aminosäuren teilweise variabel sind. Die Domänen Flo1A_{Wn17}, Flo1A_{Wn18} und Flo1A_{Br1} wiesen keine Flokkulation auf. Zwar sind alle der für die Bindung von Mannobiose kritischen Aminosäuren identisch mit Flo1A_{Σ1278b}, ansonsten gibt es jedoch Unterschiede sowohl innerhalb der Subdomäne als auch in der PA14-Domäne (Abb. 2.21a+b). Somit konnten, hinsichtlich der Zell-Zell Adhäsion, mit Hilfe verschiedener Flo1A-Domänen funktionale und nicht-funktionale PA14/Subdomänen-Kombinationen nachgewiesen, und die teilweise Variabilität der an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren nochmals bestätigt werden.

Von den getesteten Flo5A-Domänen konnten die Domänen Flo5A_{Wn14}, Flo5A_{K12} und Flo5A_{K13} am stärksten Zell-Zell Adhäsion vermitteln (Abb. 2.24). Dabei fiel jedoch auf, dass die Domänen Flo5A_{Wn14} und Flo5A_{K12} sequentiell zwar identisch sind, sich aber sowohl in ihren maximalen Flokkulationsraten als auch in ihrem Inhibitionsverhalten gegenüber Mannose voneinander unterscheiden was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass während des Tests die Komplexbildung des Ca²⁺-Ions durch EDTA bei beiden FloA-Domänen unterschiedlich effektiv verlaufen ist. Dies ist anhand der Vergleichsmessung ohne anschließende Zugabe von CaCl₂ zu sehen. Hinsichtlich der Subdomäne unterscheiden sich die Flokkulations-vermittelnden Domänen Flo5A_{Σ1278b/S288c}, Flo5A_{Wn14/K12} und Flo5A_{K13} jeweils voneinander, was auch für die PA14-Domäne zutrifft, wodurch funktionale Unterschiede nicht allein auf die Subdomäne zurückgeführt werden können (Abb. 2.21, Abb. 2.24). Dies zeigt auch der Vergleich von Flo5A_{Wn14/K12} zu Flo5A_{Pro2}. Diese enthalten jeweils die gleiche Subdomäne, jedoch unterscheidet sich Flo5A_{Pro2}, welches keine

Flokkulation vermitteln konnte, an vier Aminosäurepositionen von Flo5A_{Wn14/K12}. Dies betrifft jedoch nicht die für die Mannobiosebindung kritischen Aminosäuren (Abb. 2.21a+b).

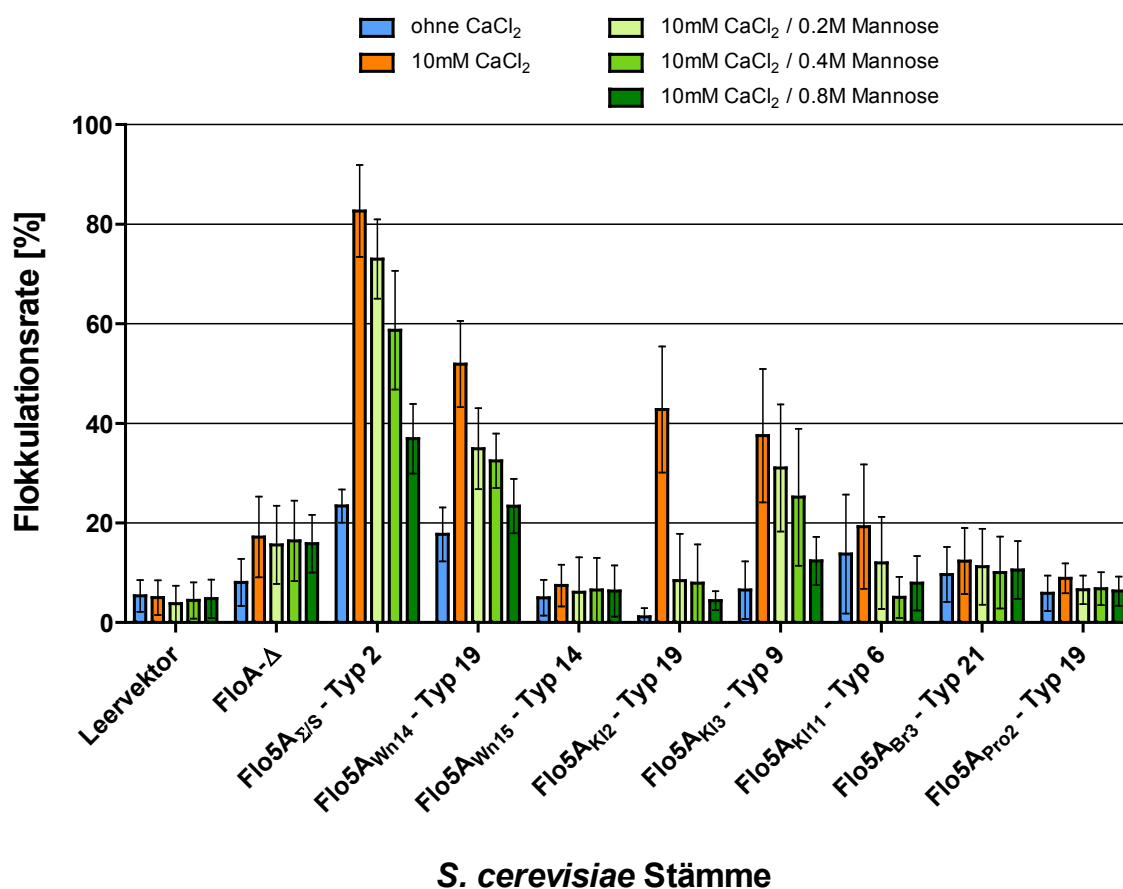
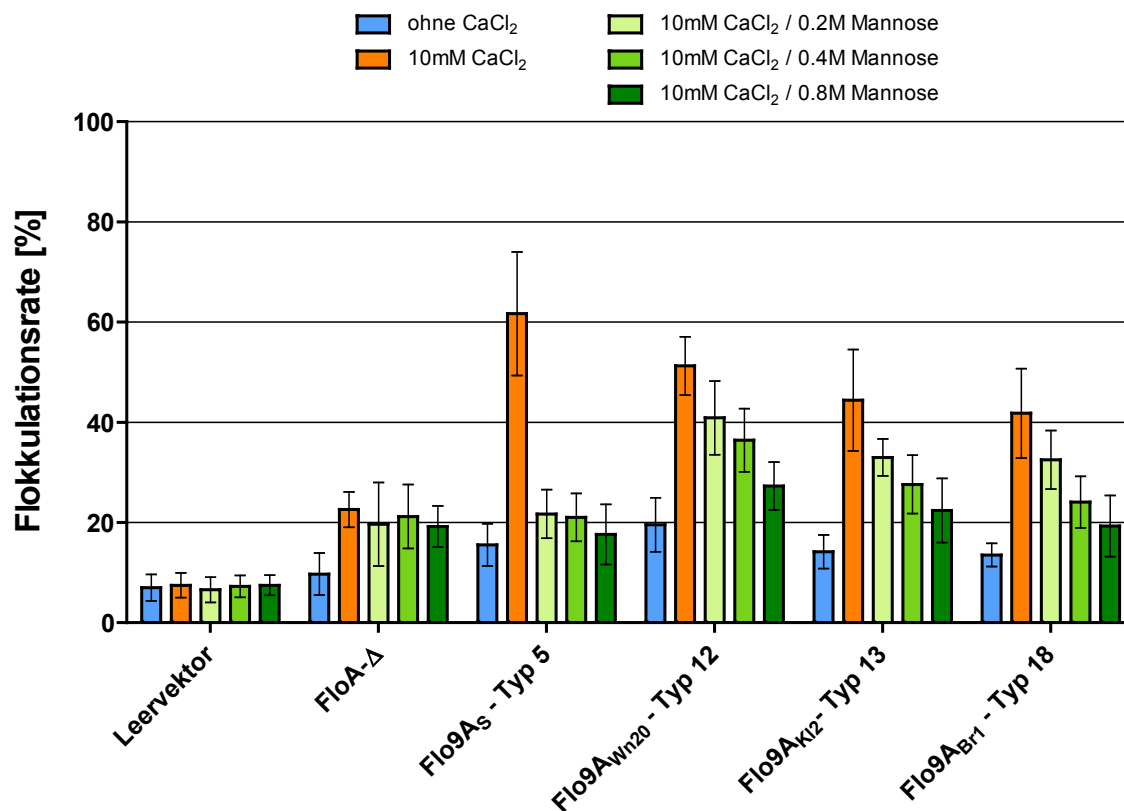


Abb. 2.24: Flokkulationstest zur Überprüfung der Zell-Zell Adhäsion verschiedener Flo5A-Domänen. Von allen getesteten Flo5A-Domänen wies Flo5A_{Wn14} nach der Referenzdomäne Flo5A_{Σ1278b/S288c} die höchste Flokkulationsrate auf. Diese konnte mit zunehmender Konzentration an freier Mannose inhibiert werden. Flo5A_{K12} und Flo5A_{K13} erreichten annähernd die gleiche Flokkulationsrate. Flo5A_{K12} war jedoch deutlich empfindlicher gegenüber Mannose als Flo5A_{K13}, dessen Flokkulation erst durch ansteigende Mannose-Konzentrationen abnahm. Die Domänen Flo5A_{Wn15}, Flo5A_{K11}, Flo5A_{Br3} und Flo5A_{Pro2} konnten keine Zell-Zell Adhäsion vermitteln. Für jede Domäne ist zusätzlich der jeweilige Subdomänentyp angegeben.

Dadurch wird neben der Art der Subdomäne, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, nochmals der Einfluss der vorhandenen PA14-Domäne auf die Funktion der FloA-Domäne hervorgehoben, was seinerseits bereits in Abschnitt 2.1.2 deutlich wurde. Für die Domänen Flo5A_{Wn15}, Flo5A_{K11}, und Flo5A_{Br3} konnte ebenfalls keine Flokkulation nachgewiesen werden. Dadurch ergaben sich letztendlich hinsichtlich der Zell-Zell Adhäsion weitere funktionale und nicht-funktionale PA14/Subdomänen-Kombinationen.

Von den Flo9A-Domänen wurden drei Domänen getestet, welche jeweils in einem *S. cerevisiae*-Stamm aus der Weinindustrie, der Brauerei-Industrie, und in einem klinischen

Isolat gefunden wurden. Die Proteinsequenzen der Domänen unterscheiden sich sowohl innerhalb ihrer PA14-Domäne als auch in ihrer Subdomäne voneinander, jedoch nur geringfügig (Abb. 2.21a+b). Im Gegensatz dazu gibt es größere Sequenzabweichungen zur Referenzdomäne Flo9A_{S288c}, welche auch die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren an den Positionen 117 und 227 betreffen. Während die zu testenden Flo9A-Domänen an diesen Positionen, wie auch Flo5A_{Σ1278b/S288c}, ein Glutamin und ein Serin enthalten, sind dies bei Flo9A_{S288c} ein Prolin und ein Alanin. Trotzdem wies Flo9A_{S288c} die höchste Flokkulationsrate auf (Abb. 2.25).



S. cerevisiae Stämme

Abb. 2.25: Flokkulationstest zur Überprüfung der Zell-Zell Adhäsion verschiedener Flo9A-Domänen. Obwohl alle drei der getesteten Flo9A-Domänen aus *S. cerevisiae*-Stämmen von unterschiedlicher Herkunft stammten, wurde für diese eine etwa gleich starke Flokkulationsrate gemessen. Auch das Inhibitionsverhalten gegenüber freier Mannose war bei diesen Domänen vergleichbar und gemessen an der Referenzdomäne Flo9A_{S288c} eher schwach ausgeprägt. Für jede Domäne ist zusätzlich der jeweilige Subdomänentyp angegeben.

Die Flokkulationsraten von Flo9A_{Wn20}, Flo9A_{Br1}, und Flo9A_{Kl2} waren dagegen niedriger, aber etwa gleich stark. Auch das Inhibitionsverhalten gegenüber freier Mannose war zwischen diesen Domänen vergleichbar. Dabei war die Mannose-Sensitivität von Flo9A_{Wn20}, Flo9A_{Br1} und Flo9A_{Kl2} aber weniger stark ausgeprägt als im Vergleich zur Referenzdomäne Flo9A_{S288c}.

Basierend auf diesen Ergebnissen mit verschiedenen Flo9A-Domänen konnte nochmal sehr deutlich gezeigt werden, dass die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren variabel sind, und dass die letztendliche Adhäsionsstärke auch abhängig ist von der Art der FloA-Domäne insgesamt. Dabei reichen relativ wenige Abweichungen in der Aminosäuresequenz aus um funktionale Unterschiede zu erreichen, was der Vergleich zwischen der Referenzdomäne Flo9A_{S288c} und den Flo9A_{Wn20}-, Flo9A_{Br1}-, und Flo9A_{K12}-Domänen zeigt (Abb. 2.25, Abb. 2.21a+b).

Nachdem von dem *S. cerevisiae*-Stamm K12 alle drei FloA-Domänen, Flo1A, Flo5A, und Flo9A, auf ihre Zell-Zell Adhäsion hin überprüft werden konnten war es möglich, einen Vergleich zu den Ergebnissen der Laborstämme Σ 1278b und S288c herzustellen. In Abb. 2.26 wurden die Flokkulationsraten der Flo1A_{K12}-, Flo5A_{K12}-, und Flo9A_{K12}-Domänen für diesen Stamm nochmal zusammengefasst.

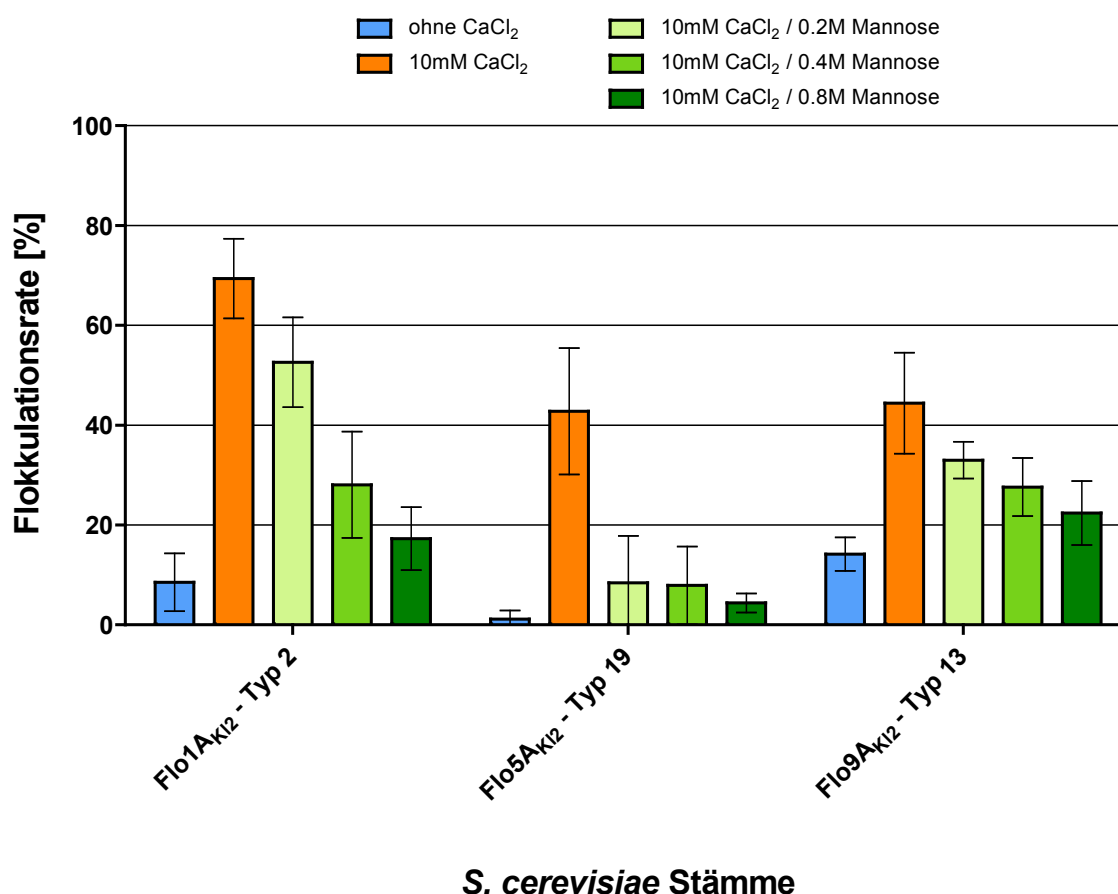


Abb. 2.26: Vergleich zwischen den Flokkulationsraten von Flo1A, Flo5A, und Flo9A aus dem *S. cerevisiae*-Stamm K12. In diesem Stamm konnte für Flo1A die höchste Flokkulationsrate von 69 % gemessen werden. Flo5A und Flo9A erreichten mit 43 %, bzw. 44 %, eine gleiche starke Zell-Zell Adhäsionsrate. Flo5A erwies sich dabei jedoch als deutlich empfindlicher gegenüber der Inhibition durch freie Mannose. Für jede Domäne ist zusätzlich der jeweilige Subdomänentyp angegeben.

Dabei wurde deutlich, dass nicht die Flo5A-Domäne, wie dies bei den Laborstämmen der Fall war (Abb. 2.3), die höchste Flokkulationsrate aufwies, sondern Flo1A_{K12}. Darüber hinaus war die schwächste Flokkulationsrate bei den Laborstämmen für die Flo9A-Domänen gemessen worden. Flo9A_{K12} weist dagegen eine vergleichbar starke Zell-Zell Adhäsion wie Flo5A_{K12} auf.

2.4.3.5 Messung der Agar-Adhäsion repräsentativer FloA-Domänen eines Subdomänentyps

Zusätzlich zur Messung ihres Zell-Zell Adhäsionsvermögens wurden die verschiedenen FloA-Domänen in einem Agar-Adhäsionstest auf ihre Adhäsion an eine zellfremde Oberfläche hin überprüft. Dabei dienten der Leervektor und der Vektor ohne FloA-Domäne (FloA-Δ), wie schon beim Flokkulationstest, als Negativkontrollen. Da für die Flo11A-Domäne aus dem Laborstamm Σ1278b bereits bekannt war, dass sie Agar-Adhäsion vermitteln kann, wurde diese als Positivkontrolle verwendet. Die Inkubationszeit wurde bei diesen Tests im Vergleich zu denen in Abschnitt 2.1.3 und 2.2.3 verkürzt, um besser zwischen stark und schwach adhätierenden Domänen unterscheiden zu können. Die Plasmid-tragenden *S. cerevisiae*-Stämme wurden großflächig auf YEPD Agar-Medium ausgestrichen und die Platten anschließend für 1 Tag bei 30 °C, und für 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden diese mit dH₂O gewaschen und getrocknet.

Von den getesteten Flo1A-Domänen konnten, neben der Referenzdomäne Flo1A_{Σ1278b} für die bereits eine schwache Adhäsion an Agar nachgewiesen worden war (Abschnitt 2.1.3), auch Flo1A_{K12}, Flo1A_{K14}, Flo1A_{Wn18}, und Flo1A_{Br1} Agar-Adhäsion vermitteln (Abb. 2.27a). Bei Flo1A_{K12}, Flo1A_{K14}, und Flo1A_{Br1} erwies sich diese zudem als deutlich stärker im Vergleich zur Referenzdomäne und Flo1A_{Wn18}. Für Flo1A_{Wn17} konnte in diesem Test keine Adhäsion nachgewiesen werden. Somit konnte ein Großteil der getesteten Flo1A-Domänen Agar-Adhäsion vermitteln.

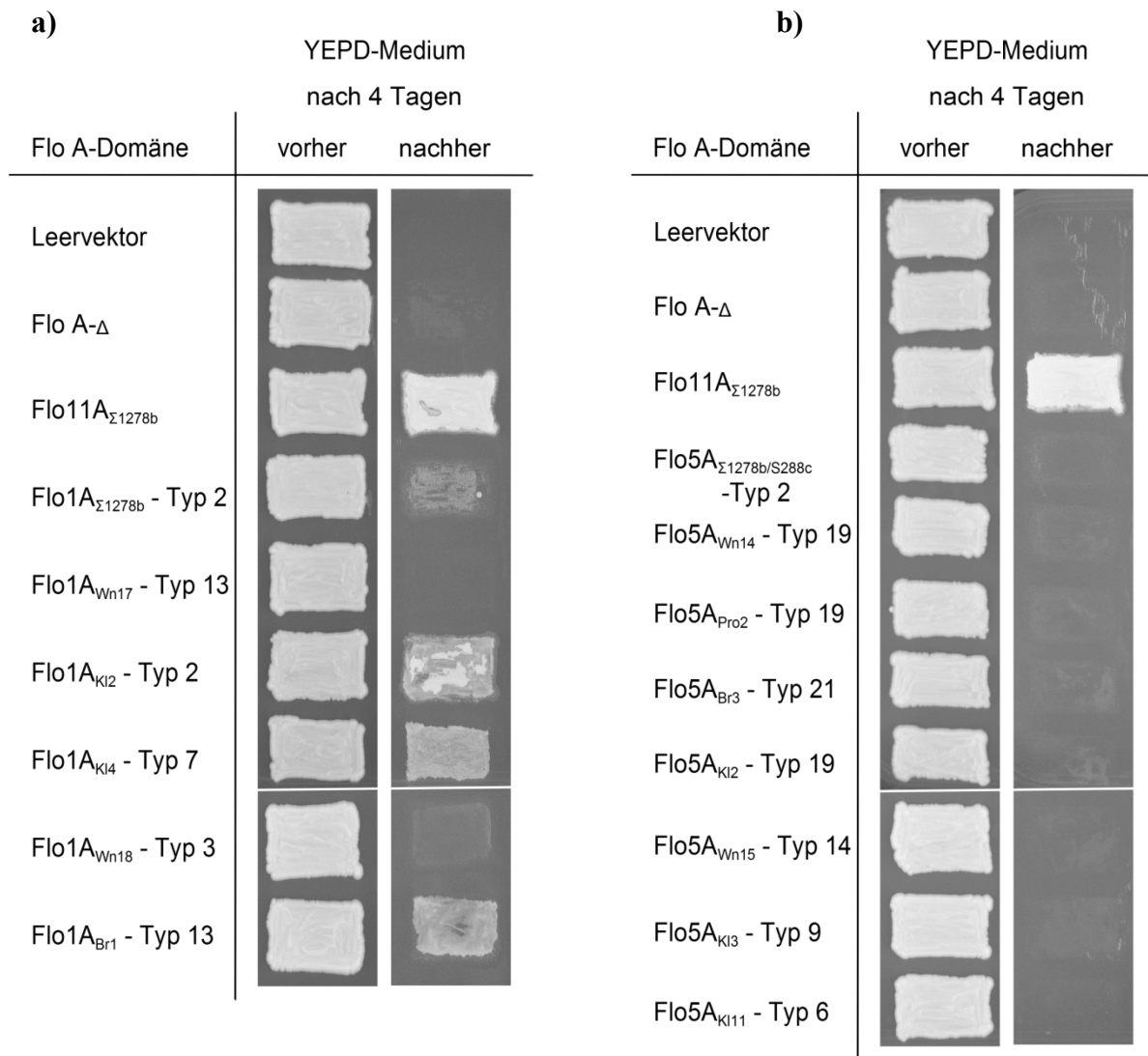


Abb. 2.27: Agar-Adhäsionstest zur Überprüfung der Adhäsion an eine zellfremde Oberfläche, welche durch verschiedene Flo1A- und Flo5A-Domänen vermittelt wird. (a) Von allen getesteten Flo1A-Domänen konnten, bis auf Flo1A_{Wn17}, neben der Positivkontrolle Flo11A_{Σ1278b} und der Referenzdomäne Flo1A_{Σ1278b} alle Domänen an Agar binden. (b) Dagegen konnte keine der getesteten Flo5A-Domänen Adhäsion an Agar vermitteln.

Für die verschiedenen Flo5A-Domänen ergab der Agar-Adhäsionstest, wie schon für die Flo5A_{Σ1278b/S288c}-Referenzdomäne, dass keine der Domänen an Agar adhären kann (Abb. 2.27b). Im Gegensatz dazu wiesen alle drei der getesteten Flo9A-Domänen Agar-Adhäsion auf (Abb. 2.28). Lediglich die Referenzdomäne Flo9A_{S288c} konnte nach 4 Tagen Inkubationszeit nicht an Agar adhären, was aber anhand vorheriger Ergebnisse erwartet worden war (Abschnitt 2.1.3).

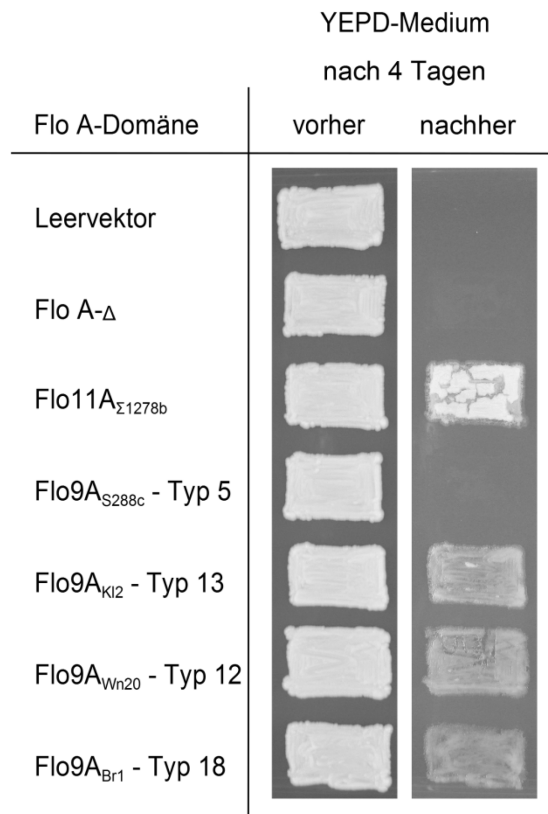


Abb. 2.28: Agar-Adhäsionstest zur Überprüfung der Adhäsion an eine zellfremde Oberfläche, welche durch verschiedene Flo9A-Domänen vermittelt wird. Im Gegensatz zur Referenzdomäne Flo9A_{S288c} konnten alle drei der getesteten Flo9A-Domänen an Agar adhärieren. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der *S. cerevisiae*-Stämme aus welchen die Domänen stammten, erwies sich die Agar-Adhäsion aller Flo9A-Domänen als annähernd gleich stark.

Abb. 3.1: Vergleich der FloA-Proteinsequenzen. Die Subdomäne ist blau, und die an der Bindung von α -1,2-Mannobiose beteiligten Aminosäuren sind schwarz umrandet. Darüber hinaus ist die Position der Ligand-bindenden Aminosäuren im Gesamt-Protein am Beispiel von Flo5A angegeben.

unterscheiden sich dagegen stellenweise in ihrer Proteinsequenz voneinander. Dabei betrifft aber keine der Sequenzabweichungen die für die Ligandenbindung entscheidenden Aminosäuren Q98, Q117, S227 oder das DcisD-Motiv. Demnach sind die funktionalen Unterschiede in der restlichen PA14-Domäne festgelegt. Die beiden Flo9A-Domänen unterscheiden sich dagegen in ihrem Flokkulationsverhalten voneinander. Dabei konnte Flo9A_{S288c} eine schwache Flokkulation vermitteln, während für Flo9A_{Σ1278b} bei diesem Test keine Adhäsion nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.3). Es bleibt aber bislang unklar, auf welche sequentiellen Unterschiede dies zurückzuführen zu. Bei beiden Domänen befindet sich an Position 117 anstatt eines Glutamins ein Prolin oder Lysin. Bei Flo9A_{S288c} befindet sich zudem an Position 227 anstelle einer Serin eine Alanin-Seitenkette. Da die Domäne dennoch funktional ist deutet dies auf eine erhöhte Variabilitäts-Toleranz an den Positionen 117 und 227 innerhalb der PA14-artigen Flo-Adhäsionsdomänen hin (siehe auch Abschnitt 3.3.4). Beim Vergleich der Flo9A-Domänen zu der Flo5A- und den Flo1A-Domänen fällt jedoch auf, dass die Subdomäne von Flo9A_{S288c} eine deutlich höhere Ähnlichkeit zu den Flo1A und Flo5A Subdomänen aufweist als Flo9A_{Σ1278b} (Abb. 3.1).

Flo10A weicht in seiner Primärstruktur, insbesondere aufgrund der deutlich längeren und sequenziell stark abweichenden Subdomäne, von den Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen ab. Dennoch sind alle der in Flo5A an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren auch in Flo10A vorhanden, mit Ausnahme von Q98 (Abb. 3.1). Stattdessen befindet sich in Flo10A an dieser Position eine Aspartat-Seitenkette, welche entweder zur Ligandenbindung beiträgt oder die Bindung findet, bedingt durch die Flo10A Subdomänen-Konformation, mit Hilfe des nahe gelegenen Q108 statt. Trotz des Vorhandenseins der meisten für die Ligandenbindung kritischen Aminosäuren, ist die Flokkulationsrate welche durch Flo10A vermittelt wird nur etwa halb so hoch wie die von Flo5A (Abb. 2.3). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich aufgrund der sehr individuellen Flo10A-Subdomäne um veränderte sterische und biochemische Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen Adhäsionsdomäne und Ligand handelt. Dem widerspricht zunächst die strukturell nachgewiesene Bindung von D-Mannose durch Flo10A, welche in Abb. 3.2 nochmal vergleichend mit Flo5A dargestellt ist. Hier konnte für die Bindung zwischen dem DcisD-Motiv und D-Mannose gezeigt werden, dass sich die Abstände zwischen Protein und Ligand bei beiden kaum voneinander unterscheiden. Da in der Struktur von Flo10A jedoch nur der Beginn und das Ende der Subdomäne zu sehen sind konnte bisher nicht gezeigt werden, welche weiteren Aminosäure-Seitenketten tatsächlich an der Bindung von D-Mannose beteiligt sind, oder der Abstand zwischen beiden

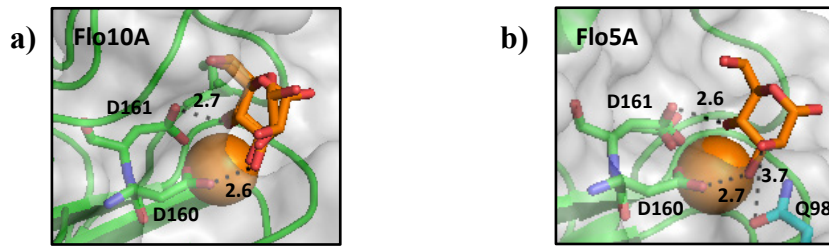


Abb. 3.2: Bindung von D-Mannose durch Flo10A und Flo5A. (a) Bindung von D-Mannose durch das DcisD-Motiv von Flo10A. (b) Bindung von D-Mannose durch das DcisD-Motiv von Flo5A. Bei beiden Abbildungen sind die Abstände zwischen den Aminosäure-Seitenketten und dem Liganden in Ångström angegeben. Diese unterscheiden sich in beiden Protein-Ligand-Komplexen nur geringfügig voneinander (Flo5A PDB-ID 2XJP aus Veelders *et al.*, 2010).

bestimmt werden. Zudem könnten Unterschiede in der Bindungs-Entropie zwischen beiden Adhäsion-Ligand-Komplexen, in diesem Zusammenhang Unterschiede in der Wasserstruktur, ein Grund für die schwächere Ligandenbindung durch Flo10A sein. Der Grund warum nicht die vollständige Struktur der Flo10A-Domäne gelöst werden konnte besteht möglicherweise in einer allgemein hohen Beweglichkeit der Flo10A-Subdomäne. Darüber hinaus befinden sich in dem bisher nicht-sichtbaren Bereich der Subdomäne drei weitere Cystein-Seitenketten, was theoretisch die Ausbildung von zwei alternativen Disulfidbrücken ermöglichen würde. Dadurch könnte es zu alternierenden Subdomänen-Konformationen der im Kristall vorhandenen Flo10A-Domänen kommen.

3.1.2 Agar-Adhäsion

Während Flo10A im Flokkulationstest nur eine vergleichsweise schwache Zell-Zell Adhäsion vermitteln konnte, wies es im Agar-Adhäsionstest von allen getesteten PA14-artigen Flo-Adhäsionsdomänen die stärkste Adhäsion auf (Abb. 2.4). Auch Flo1A_{Σ1278b} konnte nach 6 Tagen Inkubationszeit schwach an Agar adhärieren. Im Gegensatz dazu konnte für die Domänen Flo1A_{S288c}, Flo9A_{Σ1278b} und Flo9A_{S288c} erst nach 10 Tagen Inkubationszeit eine ebenfalls schwache Agar-Adhäsion nachgewiesen werden, bzw. konnte für Flo5A auch nach diesem Zeitraum keine Agar-adhäsiven Eigenschaften beobachtet werden. Der Mechanismus welcher der Agar-Adhäsion zugrundeliegt ist bislang unklar. Bei der durch Flo11 vermittelten Agar- und Plastik-Adhäsion wurde bisher vermutet, dass es sich dabei um hydrophobe Wechselwirkungen handelt, da dessen Expression nachweislich die Hydrophobizität der Zelloberfläche erhöht (Reynolds and Fink, 2001). Der gleiche Effekt wurde auch für die

anderen Flo-Proteine nachgewiesen (Van Mulders *et al.*, 2009). Bei Flo10A sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch eher für die Bindung eines oder mehrerer Liganden, da u.a. gezeigt werden konnte, dass für die durch Flo10A vermittelte Agar-Adhäsion eine vollständige FloA-Domäne, bestehend aus einer PA14-Domäne und einer Subdomäne, benötigt wird (Abb. 2.8). Dabei ist es zwar ausreichend wenn nur eine der beiden Komponenten aus Flo10A stammt, es wurde jedoch ein größerer Einfluss der Flo10A PA14-Domäne beobachtet. Die PA14-Domäne von Flo10A ist alleine nicht in der Lage an Agar zu adhären, wie es bei einer hydrophoben Wechselwirkung zu erwarten gewesen wäre (Abb. 2.8). Da Agar hauptsächlich aus Galaktose besteht wurde diese zunächst als möglicher Ligand vermutet. *In vitro* Messungen mit aus *E. coli* aufgereinigten FloA-Domänen ergaben, dass Flo10A in der Lage ist Galaktose zu binden (Tab. 2.6). Dies konnte jedoch für die chimäre Flo10A^{SSD}-Domäne nicht nachgewiesen werden, obwohl diese an Agar adhären kann (Abb. 2.8), wonach bei dieser Form der Adhäsion ein anderer Ligand als Galaktose gebunden wird.

Bei einem Vergleich aller verfügbarer FloA-Proteinstrukturen welche in dieser Arbeit verwendet wurden stellte sich heraus, dass diese innerhalb der PA14-Domäne weitestgehend eine einheitliche Konformation einnehmen. Deutliche Unterschiede ergaben sich dagegen in einer Schleife in unmittelbarer Nähe der primären Bindetasche (Abb. 3.3, Abb. 2.11).

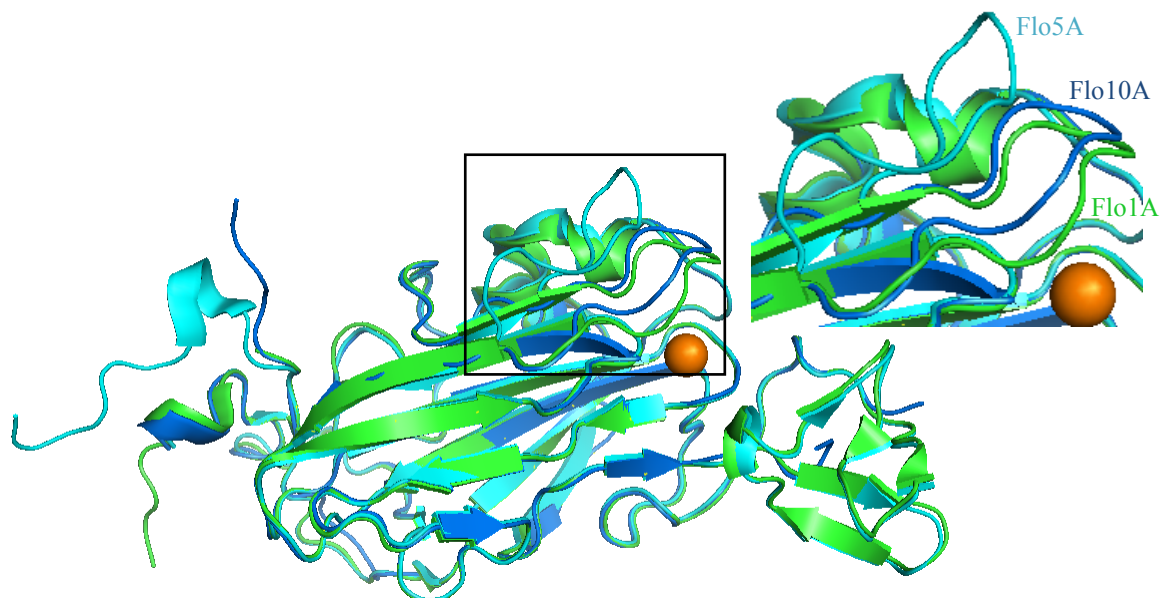


Abb. 3.3: Strukturvergleich der Flo1A_{S288c}-, Flo5A_{Σ1278b/S288c}-, und Flo10A_{Σ1278b/S288c}-Domänen. Dabei konnte gezeigt werden, dass deren PA14-Domänen größtenteils eine identische Konformation einnehmen. Eine Ausnahme besteht in einer Schleife nahe der primären Bindetasche, welche in an Agar-adhärenierenden FloA-Domänen (Flo1A und Flo10A) zur Bindetasche hin abgeflacht ist (Flo1A PDB-ID 4LHN aus Goossens *et al.*, 2015; Flo5A PDB-ID 2XJS aus Veelders *et al.*, 2010; Flo10A diese Arbeit).

Diese ist innerhalb der PA14-Domäne lokalisiert und in Flo1A_{S288c} und Flo10A_{Σ1278b/S288c} zur primären Bindetasche hin abgeflacht. In Flo5A_{Σ1278b/S288c} ist sie dagegen von der primären Bindetasche abgewandt. Nachdem Flo1A_{S288c} und Flo10A_{Σ1278b/S288c}, aber nicht Flo5A_{Σ1278b/S288c} an Agar adhären konnten, scheint eine Korrelation zwischen der Konformation dieser Schleife zur Fähigkeit Agar-Adhäsion vermitteln zu können zu bestehen (siehe auch Abschnitt 3.3.4.2).

Zusammengefasst konnte anhand der Ergebnisse mit FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ1278b und S288c (I) der direkte Einfluss von Sequenzvariationen innerhalb der PA14-Domäne auf die Zell-Zell Adhäsion nachgewiesen werden, (II) festgestellt werden, dass die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren teilweise variabel bzw. hoch konserviert sind und (III) dass bei der durch PA14-artige FloA-Domänen vermittelten Agar-Adhäsion die Bindung eines Liganden wahrscheinlicher ist als dass es sich um hydrophobe Wechselwirkungen handelt, wobei aber die Bindung von Galaktose als am naheliegendsten Liganden gleichzeitig widerlegt werden konnte.

3.2 Die Funktion der PA14-artigen FloA-Domänen ist abhängig von der Anwesenheit und Art der Subdomäne

3.2.1 Die Subdomäne als funktionsvermittelnde Untereinheit der FloA-Domänen

Nachdem der Flokkulationstest mit FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ1278b und S288c unter anderem zu der Erkenntnis führte, dass trotz identischer Subdomäne sich die Adhäsionsstärken von Flo1A_{Σ1278b}, Flo1A_{S288c} und Flo5A_{Σ1278b/S288c} voneinander unterscheiden und dies demnach auf Sequenzvariabilitäten innerhalb der jeweiligen PA14-Domänen zurückzuführen ist, sollte umgekehrt der Einfluss der Subdomäne auf die Funktionalität der Adhäsionsdomäne ermittelt werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Subdomänen zwischen Flo5A und Flo10A gegenseitig ausgetauscht, da sich diese stark in ihrer Länge und Sequenz voneinander unterscheiden (Abb. 3.1). Zudem wiesen beide FloA-Domänen bei der Zell-Zell- und Agar-Adhäsion sehr unterschiedliche Eigenschaften auf. Zusätzlich wurden von beiden Domänen Konstrukte hergestellt, in denen jeweils die Subdomäne durch eine G4S-Brücke ersetzt worden war, welche aufgrund ihrer Flexibilität dennoch die natürliche Konformation der PA14-Domänen erhalten sollte (Abb. 2.5). Die Ergebnisse welche anschließend im Flokkulations- und Agar-Adhäsionstest erzielt wurden

weisen darauf hin, dass die Subdomäne *in vivo* ein notwendiger Bestandteil der PA14-artigen FloA-Domänen ist, ohne die keine Funktion vermittelt werden kann (Abb. 2.7 und 2.8). Darüber hinaus kann ein Großteil der adhäsiven Eigenschaften, zumindest bei der Zell-Zell Adhäsion, mit Hilfe der Subdomäne auf eine chimäre Adhäsionsdomäne übertragen werden. Allerdings konnten die chimären Adhäsionsdomänen bei der Zell-Zell Adhäsion nicht die Adhäsionsstärke erreichen wie die FloA-Domänen aus denen die jeweilige Subdomäne stammte (Abb. 2.7). Demnach handelt es sich bei der Flo5A- und Flo10A-Domäne um Adhäsionsdomänen, welche strukturell ideal auf ihre Funktion hin aufgebaut sind. Die PA14-Domäne stellt dabei mehr als eine Trägerdomäne für die Subdomäne dar. Vielmehr scheint das *in vivo* beobachtete Adhäsionsverhalten das Resultat des Zusammenwirkens zwischen Subdomäne und PA14-Domäne zu sein. Dies zeigte sich beispielsweise beim Agar-Adhäsionstest, bei dem zwar die beiden chimären Adhäsionsdomänen, Flo5A^{10SD} und Flo10A^{5SD}, Adhäsion vermitteln konnten, diese jedoch für Flo10A^{5SD} etwas stärker ausfiel (Abb. 2.8). Beim strukturellen Vergleich der Flo10A^{5SD}-Domäne mit Flo5A und Flo10A fiel auf, dass die bereits in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Schleife welche mit Agar-Adhäsion in Verbindung gebracht wird, in der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne größtenteils die gleiche Konformation einnimmt wie die in Flo5A (Abb. 3.4).

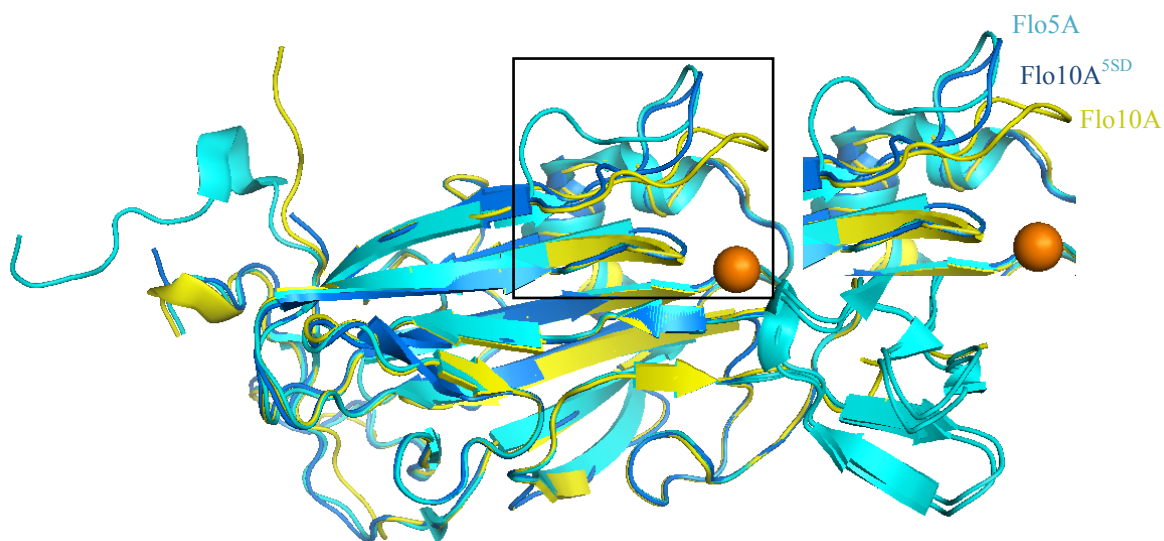


Abb. 3.4: Struktureller Vergleich der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne mit Flo5A und Flo10A. Dabei zeigte sich, dass die Struktur der PA14-Domäne in der chimären Domäne, welche aus Flo10A stammt, der von Flo5A angeglichen wurde aber nicht vollständig mit ihr übereinstimmt. Diese Veränderung wird auf die Subdomäne zurückgeführt. Demnach stellen die PA14-Domäne und die Subdomäne zusammen eine eher dynamische Struktur dar, als dass die PA14-Domäne als reine Trägerdomäne für die Subdomäne dient (Flo5A PDB-ID 2XJS aus Veelders *et al.*, 2010, Flo10A und Flo10A^{5SD} diese Arbeit).

Demnach wurde die Struktur der PA14-Domäne, welche aus Flo10A stammt, der neuen Subdomäne aus Flo5A angeglichen, wobei sie aber nicht vollständig mit der aus Flo5A übereinstimmt. Daher handelt es sich bei den PA14-artigen FloA-Domänen insgesamt um dynamische Strukturen, deren Konformation und Funktion aber größtenteils durch die Subdomäne vorgegeben wird.

Der große Einfluss der Subdomäne auf die Funktion der FloA-Domäne ist insofern überraschend, als dass beispielsweise die EpaA-Domänen, sowie LgFlo1A, keine ausgeprägten Subdomänen enthalten, sondern mehr oder weniger ausgedehnte Schleifen (Abb. 1.9a). Allerdings weisen diese Domänen auch ihr eigenes und, im Vergleich zu Flo5A, ausgedehnteres Ligandenspektrum auf (Veelders *et al.*, 2010; Maestre-Reyna *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2013; Doktorarbeit Rike Diderrich). Dies legt die Vermutung nahe, dass je offener die Proteinstruktur an der Liganden-Bindungsstelle ist, dies potentiell die Bindung von mehr Saccharid-Liganden ermöglicht. Eine eher geschlossene Struktur, wie die Bindetasche von Flo5A, schränkt dagegen die Zahl der Liganden ein und sorgt so für dessen Spezifität. Dies konnte am Beispiel von Flo5A durch *in vitro* Messungen bestätigt werden, welche im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden.

3.2.2 Die PA14-artigen FloA-Domänen stellen eine optimierte Version für ihre *in vivo* Funktion dar

Die Ergebnisse aus den *in vivo* Messungen sollten *in vitro* bestätigt werden, indem die genaue Bindungsaffinität von aus *E. coli* aufgereinigten FloA-Domänen gegenüber ausgewählten Saccharid-Liganden mit Hilfe von Fluoreszenz-Spektroskopie bestimmt wurde. Nachdem die aus diesen Messungen resultierenden Dissoziationskonstanten aber nicht immer mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Tests übereinstimmten wirft dies die Vermutung auf, dass die Bindungsstärke zwischen dem Protein und dem terminalen Saccharid eines Oligosaccharids nur einen Teil der Gesamt-Bindungsstärke ausmachen. Darüber hinaus scheinen weitere biochemische und sterische Wechselwirkungsmöglichkeiten für die *in vivo* gemessene Affinitätsstärke entscheidend zu sein. Beispielsweise konnte anhand der gewonnenen Werte festgestellt werden, dass Flo10A^{SSD} im Vergleich zur Flo5A-Domäne *in vitro* eine etwa 40-fach höhere Affinität zu D-Mannose und α -1,2-Mannobiose aufweist (Tab. 2.6, Abb. 2.10). Interessanterweise konnte die erhöhte Liganden-Affinität von Flo10A^{SSD} im Flokkulationstest aber nur anhand der Inhibition durch D-Mannose beobachtet werden. Die maximale

Flokkulationsrate von Flo10A^{SSD} war dagegen etwas niedriger als die von Flo5A (Abb. 2.7). Durch Kristallisation von Flo10A^{SSD} zusammen mit D-Mannose und α -1,2-Mannobiose konnten von den Abständen zwischen Protein und Ligand her jedoch keine großen Unterschiede zu Flo5A nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

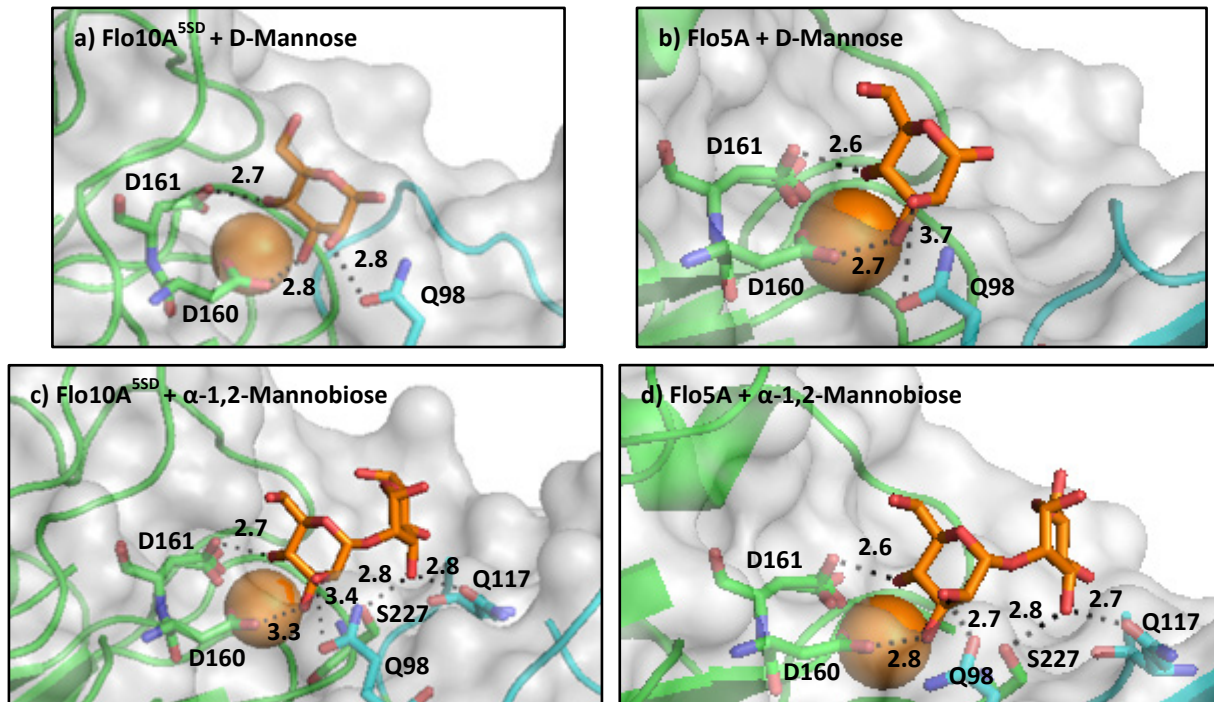


Abb. 3.5: Bindung der Liganden D-Mannose und α -1,2-Mannobiose durch Flo10A^{SSD} und Flo5A. (a) Bindung von D-Mannose durch Flo10A^{SSD}. (b) Bindung von D-Mannose durch Flo5A. (c) Bindung von α -1,2-Mannobiose durch Flo10A^{SSD}. (d) Bindung von α -1,2-Mannobiose durch Flo5A. Die Abstände zwischen den Aminosäure-Seitenketten und den Liganden sind in Ångström angegeben (Flo5A PDB-ID 2XJP und 2XJS aus Veelders *et al.*, 2010, Flo10A^{SSD} diese Arbeit).

Die Abstände zwischen den Liganden und den für die Bindung verantwortlichen Aminosäure-Seitenketten sind in beiden Domänen in etwa gleich. Diese teilweise gegensätzlichen Ergebnisse könnten zum einen auf eine veränderte Wasserstruktur innerhalb der primären Bindetasche von Flo10A^{SSD}, und damit auch auf eine unterschiedliche Bindungsentropie, zurückzuführen sein. Darüber hinaus könnte die Bindetasche von Flo10A^{SSD} keine optimalen biochemische und/oder sterische Bindemöglichkeiten für Oligosaccharide in der Zellwand benachbarter Zellen mehr bieten, wodurch die Flokkulationsrate im Vergleich zu Flo5A reduziert ist. Dennoch ist sie so ausgeformt, dass ihre Spezifität gegenüber bestimmten Sacchariden erhalten bleibt wie sich anhand der *in vitro* Messungen herausstellte, bei der weder Flo5A noch Flo10A^{SSD} D-Galaktose binden konnten (Tab. 2.6). Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass die Adhäsionsinhibition von Flo10A^{SSD} und Flo5A durch

Zugabe von 0,8 M D-Glukose im Flokkulationstest etwa gleich stark ausfiel, obwohl Flo10A^{5SD} *in vitro* im Vergleich zu Flo5A eine 4-fach höhere Affinität zu Glukose aufwies (Abb. 2.7, Tab. 2.6, Abb. 2.10). Möglicherweise ist der Unterschied in der Glukose-Affinität jedoch zu gering, um ihn *in vivo* nachweisen zu können. Insgesamt stellt sich die Frage, warum die FloA-Domänen keine höhere Liganden-Bindungsstärke aufweisen, obwohl dies anhand von Flo10A^{5SD} nachweisbar möglich ist. Vermutlich wirkt sich aber eine zu hohe Affinitätsstärke für die einzelne *S. cerevisiae*-Zelle wiederum nachteilig aus wenn es beispielsweise darum geht, von einer mehrzelligen (z. B. Flocken) wieder in eine unizelluläre Form zu wechseln.

Beim Vergleich zwischen den Ergebnissen der *in vivo* und *in vitro* Messungen stellte sich zusätzlich die Frage, ob das Fehlen der Protein-Glykosylierung bei den aufgereinigten FloA-Domänen einen Einfluss auf die Ergebnisse der *in vitro* Messungen hat. Dagegen spricht aber, dass beispielsweise die Differenz zwischen den Flokkulationsraten von Flo5A und Flo10A und den *in vitro* gemessenen Affinitäten gegenüber D-Mannose und α -1,2-Mannobiose jeweils übereinstimmt. Sowohl die Flokkulationsrate als auch die entsprechenden Dissoziationskonstanten von Flo10A sind etwa halb so hoch wie die von Flo5A (Abb. 2.7, Tab. 2.6, Abb. 2.10).

Nachdem im vorherigen Abschnitt 3.2.1 bereits die Bedeutung der Subdomäne für die *in vivo* Funktion der PA14-artigen FloA-Domänen hervorgehoben wurde, sollte dies auch durch die *in vitro* Messungen bestätigt werden. Dazu wurde die Ligandenaffinität der Subdomänen-deletierten Flo5A^{ΔSD}-Domäne, welche *in vivo* keine adhäsiven Eigenschaften aufwies, mit Hilfe von Fluoreszenz-Spektroskopie gemessen. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, dass die Flo5A^{ΔSD}-Domäne nach wie vor alle gemessenen Liganden mit der gleichen Affinität binden kann wie Flo5A (Tab. 2.6, Abb. 2.10). Darüber hinaus ist sie, wie auch Flo10A, in der Lage Galaktose zu binden. Demnach wurde durch das Fehlen der Subdomäne die Ligandenspezifität der Flo5A-Domäne aufgehoben. Nachdem sie dennoch *in vivo* keine Adhäsion vermitteln kann scheint der Wegfall von Ligand-Bindestellen, beispielsweise von Q98 und Q117 innerhalb der Subdomäne, sowie eventuell weiterer Seitenketten welche für die Bindung von Oligosacchariden benötigt werden, die Funktion der Flo5A-Domäne *in vivo* aufzuheben.

Zusammengefasst konnte anhand der erzielten Ergebnisse die Rolle der Subdomäne für die adhäsiven Eigenschaften und die Ligandenspezifität der PA14-artigen FloA-Domänen hervorgehoben werden, da (I) die PA14-Domänen von Flo5A und Flo10A alleine *in vivo* keine Adhäsivität aufweisen, (II) die Flokkulationsrate der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne im Vergleich zur ursprünglichen Flo10A-Domäne deutlich höher ist und (III) die Flo5A^{ASD}-Domäne im Gegensatz zur Flo5A-Domäne Galaktose binden kann.

3.3 Die sequenzielle und funktionale Variabilität der PA14-artigen Flo-Adhäsionsdomänen

3.3.1 Phylogenetische Analyse der Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen

Um einen Eindruck zu gewinnen, inwiefern sich die Ergebnisse welche anhand der PA14-artigen FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c erzielt wurden auf *Saccharomyces*-Stämme außerhalb des Labors übertragen lassen, wurden in dieser Arbeit aus verschiedenen Stämmen die *FLO1A*-, *FLO5A*-, *FLO9A*-, und *FLO10A*-Gensequenzen isoliert. Die daraus resultierenden Proteinsequenzen wurden zunächst in einer phylogenetischen Analyse einander verwandtschaftlich zugeordnet. Diese ergab unter Berücksichtigung der jeweiligen Signalsequenz eine klare Gruppierung der FloA-Domänen nach ihrem Flo-Typ (Abb. 2.13). Wurden dagegen nur die FloA-Domänen miteinander verglichen ergab dies eine eher mosaikartige Baumstruktur was darauf schließen lässt, dass es, wie schon von Christiaens *et al.* (2010) angedeutet, innerhalb der *FLOA*-Domänen zu Rekombinationsereignissen kommt (Abb. 2.14). Dies scheint zwischen den *FLO1A*-, *FLO5A*-, und *FLO9A*-Domänen in allen möglichen Kombinationen zu erfolgen, da einzelne Gruppen dieser FloA-Domänen phylogenetisch nahe einander zugeordnet wurden. Eine Ausnahme bildet Flo10A, welches eine fast vollständig in sich geschlossene Gruppe darstellt. Es wurden lediglich zwei Flo5A-Domänen isoliert, welche entfernt mit Flo10A verwandt sind (Abb. 2.14).

3.3.2 Die sequenzielle Variabilität der Flo1A-, Flo5A-, Flo9A-, und Flo10A-Domänen

Nach der ersten phylogenetischen Analyse aller isolierter FloA-Domänen folgte ein detaillierter, sequentieller Vergleich der Domänen nach ihrem FloA-Typ. Dabei ergab der sequentielle Vergleich der Flo1A- und Flo9A-Domänen eine etwa gleich hohe Variabilität. Bei beiden wurden drei Hauptgruppen identifiziert, deren Proteinsequenzen untereinander nahezu vollständig identisch sind, sowie einzelne individuelle Domänen (Abb. 2.15 und 2.17). Diese vereinzelt identifizierten Domänen stellen möglicherweise Vertreter einer zusätzlich vorhandenen Gruppe dar, welche anhand der begrenzten Anzahl an verwendeten *Saccharomyces*-Stämmen nicht vollständig erfasst wurde. Die vergleichbare Sequenzvariabilität der Flo1A- und Flo9A-Domänen könnte auf die chromosomale Lokalisation zurückzuführen sein. Sowohl *FLO1* als auch *FLO9* befinden sich auf Chromosom I in etwa gleichem Abstand von 27 kb, bzw. 28 kb, vom Chromosomenende entfernt. Beide Regionen enthalten nach Gerton *et al.* (2000) Rekombinations-Hotspots (Abb. 3.6).

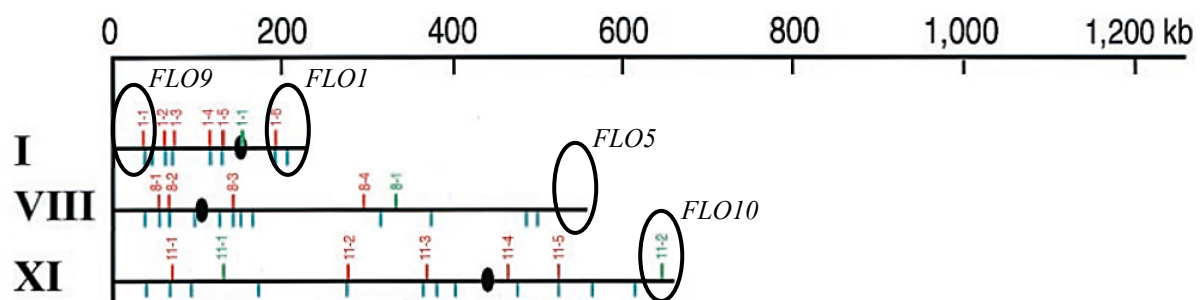


Abb. 3.6: Einteilung der *S. cerevisiae*-Chromosome I, VIII, und XI in Bereiche mit häufigen und seltenen Rekombinationsereignissen. Die roten Markierungen geben Abschnitte mit vielen („Hotspot“), die grünen Markierungen solche mit seltenen („Coldspot“) Rekombinationsvorkommen an. Darüber hinaus ist die Lokalisation der *FLO1*-, *FLO5*-, *FLO9*-, und *FLO10*-Gene in den Subtelomeren-Bereichen der jeweiligen Chromosomen durch eine schwarze Umrandung markiert (Aus Gerton *et al.*, 2000).

Die höchste Sequenzvariabilität wurde für die Flo5A-Domänen nachgewiesen. Allein bei diesen Domänen wurden sieben Hauptgruppen, sowie einzelne individuelle FloA-Domänen identifiziert (Abb. 2.16). *FLO5* befindet sich im telomeren Bereich auf Chromosom VIII. Ob die genomische Lokalisation in diesem Fall ebenfalls eine Rolle für die Rekombinationshäufigkeit spielt bleibt zunächst unklar, da diese Region von Gerton *et al.* weder als Rekombinations-Hotspot noch als Rekombinations-Coldspot charakterisiert wurde (Abb. 3.6).

Flo10A erwies sich als nahezu invariabel, wobei sowohl vollständige Flo10A-Domänen als auch eine Pseudogen-Sequenz isoliert wurden (Abb. 2.18 und 2.19). Dass grundsätzlich zwei Varianten in den Stämmen vorhanden sind ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei diesen sehr wahrscheinlich um diploide oder sogar polyploide Zellen handelt. Die hohe Konservierung der vollständigen Flo10A-Domäne könnte einerseits in deren erweiterten Adhäsionseigenschaften begründet sein. Sollte eine funktionale Version von Flo10A für die einzelne Zelle von hoher Bedeutung sein, hätte dies vermutlich einen hohen Selektionsdruck zur Folge. Eine weitere Möglichkeit besteht in der genomischen Lokalisation von Flo10A innerhalb der subtelomeren Region von ChromosomXI. Diese Region wurde von Gerton *et al.* (2000) als Bereich mit wenigen Rekombinationereignissen definiert (Abb. 3.6).

3.3.3 Rekombination findet nicht nur über die mittlere B-Domäne, sondern auch innerhalb der FloA-Domänen statt

Beim sequentiellen Vergleich aller 135 Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen fielen einheitliche Sequenzvariabilitäten an bestimmten Positionen innerhalb der Domänen auf. Diese könnten mögliche Bruchstellen für Rekombinationsereignisse darstellen. Zudem wurde teilweise die gleiche Subdomäne in FloA-Domänen verschiedener Flo-Typen gefunden. Dabei war eine bestimmte Subdomäne aber nicht in allen drei FloA-Domänen, Flo1A, Flo5A, und Flo9A vorhanden, sondern in abwechselnder Kombination in jeweils zwei Domänen-Typen. Demnach findet der Subdomänen austausch nicht wahllos statt, sondern je nach Subdomäne zwischen einem Flokkulin-Paar. Da es sehr wahrscheinlich ist, dass dieser Austausch über homologe Rekombination erfolgt, wäre eine erhöhte Sequenz-übereinstimmung in den die Subdomäne flankierenden Sequenzen zu erwarten gewesen. Dies konnte innerhalb eines *Saccharomyces*-Stammes aber nicht immer bestätigt werden, wie die beiden Beispiele in Abb. 3.7 zeigen. Dabei wurden sowohl Beispiele gefunden, bei denen ein Austausch möglich wäre als auch solche, bei denen dies eher unwahrscheinlich ist.

a)

<i>Flo1A_Wn8</i>	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
<i>Flo5A_Wn8</i>	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM	60
<i>Flo9A_Wn8</i>	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSTYSNAAYM	60
<i>Flo1A_Wn8</i>	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCGRGKR-CSNSQAV	119
<i>Flo5A_Wn8</i>	61	AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFCPQEDSFDEWGFMCNNEFCSNSQAS	120
<i>Flo9A_Wn8</i>	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYDNWRCRGKR-CSNSQAV	119
<i>Flo1A_Wn8</i>	120	SYWSTDLFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTFSFATIDDSAILSVGGSIAFECCAQE	179
<i>Flo5A_Wn8</i>	121	AYWSSDLFGFYTTPTNVTVEMTAYFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGNVAFECCAQE	180
<i>Flo9A_Wn8</i>	120	SYWSTDLFGFYTTPTNITLEITGYFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGSIAFECCAQE	179
<i>Flo1A_Wn8</i>	180	QPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYPPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPD	239
<i>Flo5A_Wn8</i>	181	QPPITSTDFTINGIKPWQGSPLDNIAGTVYMYAGYYYPLKVYSNAVSWGTLPISVELPD	240
<i>Flo9A_Wn8</i>	180	QPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYPPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPD	239
<i>Flo1A_Wn8</i>	240	GTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
<i>Flo5A_Wn8</i>	241	GTTVSDDFEGYVYSFDDDLSSQSNCTIPDPSKH	272
<i>Flo9A_Wn8</i>	240	GTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271

b)

<i>Flo1A_K12</i>	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
<i>Flo5A_K12</i>	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM	60
<i>Flo9A_K12</i>	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSTYSNAAYM	60
<i>Flo1A_K12</i>	61	AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFPCPQEDSYGNWGCCKGM-GACNSQGI	119
<i>Flo5A_K12</i>	61	AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFCPQEDSSDEWGFMCNNEFCSNSQAS	120
<i>Flo9A_K12</i>	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCGRGK-GRCSNSQAV	119
<i>Flo1A_K12</i>	120	AYWSTDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTFSFATVDDSAILSVGGSIAFECCAQE	179
<i>Flo5A_K12</i>	121	AYWSSDLFGFYTTPTNVTVEMTGYFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGNVAFECCAQE	180
<i>Flo9A_K12</i>	120	SYWSTDLFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTFSFATVDDSAILSVGGSIAFECCAQE	179
<i>Flo1A_K12</i>	180	QPPITSTNFTINGIKPWHGCLPHNIAAGTVYMYAGFYPPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPD	239
<i>Flo5A_K12</i>	181	QPPITSTDFTINGIKPWQGSPLDNIAGTVYMYAGYYYPLKVYSNAVSWGTLPISVELPD	240
<i>Flo9A_K12</i>	180	QPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYPPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPD	239
<i>Flo1A_K12</i>	240	GTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
<i>Flo5A_K12</i>	241	GTTVSDFEGYVYSFDDDLSSQSNCTIHDPSIH	272
<i>Flo9A_K12</i>	240	GTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271

Abb. 3.7: Stamminterner Vergleich der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen. (a) Vergleich der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen aus dem *Saccharomyces*-Stamm Wn8. Der Subdomänen-Typ von Flo1A_{Wn8} wurde auch in Flo9A-Domänen aus anderen Stämmen gefunden. Bei diesem stamminternen Vergleich sind die Sequenzen unmittelbar vor und nach den Subdomänen zwischen Flo1A und Flo9A identisch zueinander, im Gegensatz zu Flo5A. Dies würde Rekombinationsereignisse zwischen der Flo1A_{Wn8}- und der Flo9A_{Wn8}-Domäne theoretisch ermöglichen. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der FloA-Domäne nach der Signalsequenz, und die blaue Umrandung den Bereich der Subdomäne an. (b) Vergleich der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen aus dem *Saccharomyces*-Stamm K12. Der Subdomänen-Typ von Flo1A_{K12} wurde auch in Flo5A-Domänen aus anderen Stämmen gefunden. Bei diesem stamminternen Vergleich konnte keine erhöhte Sequenzübereinstimmung zwischen den die Subdomäne flankierenden Sequenzen von Flo1A und Flo5A beobachtet werden. Dies wäre bei einer stamminternen Rekombination zwischen Flo1A_{K12} und Flo5A_{K12} zu erwarten gewesen. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der FloA-Domäne nach der Signalsequenz, und die blaue Umrandung den Bereich der Subdomäne an.

Werden dagegen solche FloA-Domänen miteinander verglichen, welche zwar aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen isoliert wurden aber die gleiche Subdomäne

enthalten fällt auf, dass bei diesen Domänen die Sequenzen vor und nach der Subdomäne weitreichend übereinstimmen (Abb. 3.8a+b).

a)

Flo1A_Wn8	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
Flo1A_Wn26	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
Flo9A_Kl5	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM	60
Flo9A_Wn16	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM	60
Flo1A_Wn8	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo1A_Wn26	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo9A_Kl5	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo9A_Wn16	61	AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo1A_Wn8	121	YWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A_Wn26	121	YWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo9A_Kl5	121	YWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo9A_Wn16	121	YWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A_Wn8	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo1A_Wn26	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo9A_Kl5	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo9A_Wn16	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo1A_Wn8	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo1A_Wn26	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo9A_Kl5	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo9A_Wn16	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271

b)

Flo1A_Kl2	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
Flo1A_Kl17	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
Flo5A_Wn13	1	MTIAHHCIFLVILAF LALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNATYM	60
Flo5A_Wn19	1	MTIAHHCIFLVILAF LALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNATYM	60
Flo1A_Kl2	61	AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFPCPQEDSYGNWGCCKGMGACNSQGI A	120
Flo1A_Kl17	61	AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFPCPQEDSYGNWGCCKGMGACNSQGI A	120
Flo5A_Wn13	61	AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFPCPQEDSYGNWGCCKGMGACNSQGI A	120
Flo5A_Wn19	61	AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFPCPQEDSYGNWGCCKGMGACNSQGI A	120
Flo1A_Kl2	121	YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A_Kl17	121	YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo5A_Wn13	121	YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo5A_Wn19	121	YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A_Kl2	181	PPITSTNFTINGIKPWHGCLPHNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo1A_Kl17	181	PPITSTNFTINGIKPWHGCLPHNIAGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPISVTLPGD	240
Flo5A_Wn13	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNITGTVYMYAGYYYPLKVYYSNAVSWGTLPISVLELPGD	240
Flo5A_Wn19	181	PPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNITGTVYMYAGYYYPLKVYYSNAVSWGTLPISVLELPGD	240
Flo1A_Kl2	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo1A_Kl17	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo5A_Wn13	241	TTVSDNFEFYVYSFDDDLQSNCTIPDPSIH	271
Flo5A_Wn19	241	TTVSDNFEFYVYSFDDDLQSNCTIPDPSIH	271

Abb. 3.8: Sequenzieller Vergleich von Flo1A-, Flo5A- und Flo9A-Domänen aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen mit identischer Subdomäne. (a) In diesen Flo1A- und Flo9A-Domänen sind die Sequenzen vor und nach der Subdomäne (blau umrandet) bis zu zwei möglichen Bruchstellen (rot umrandet) identisch, was Rekombinationsereignisse zwischen den FloA-Domänen theoretisch ermöglichen würde. (b) Auch bei diesem Vergleich zwischen Flo1A- und Flo5A-Domänen sind die Sequenzen vor und nach der Subdomäne (blau umrandet) bis zu zwei Bruchstellen (rot umrandet) identisch. Demnach könnten auch hier Rekombinationen stattfinden bei der die Subdomäne, sowie ein Großteil der PA14-Domäne, ausgetauscht werden würde.

Demnach ist es wahrscheinlicher, dass der Austausch von Subdomänen zwischen einzelnen Stämmen stattfindet anstatt innerhalb eines Stammes. Darüber hinaus liefern die Sequenzvergleiche in Abb. 3.8 Hinweise darauf, dass der Austausch nicht unmittelbar vor und nach der Subdomäne erfolgt, sondern oft in Kombination mit einem Großteil der PA14-Domäne. Der verbleibende Teil der PA14-Domäne ist dagegen sequentiell wieder spezifisch für den jeweiligen FloA-Typ, was den nicht-austauschbaren Bereich der FloA-Domänen darstellen könnte (Abb. 3.8a+b).

3.3.4 Die PA14-artigen FloA-Domänen stellen eine funktional hoch diverse Adhäsinfamilie dar

3.3.4.1 Unterschiede im Flokkulationsverhalten zwischen FloA-Domänen aus Laborstämmen und nicht-Laborstämmen

Aus allen 135 isolierten Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen konnten in dieser Arbeit insgesamt 21 Subdomänen-Typen identifiziert werden (Abb. 2.20a+b). Einige davon wurden in nur einer FloA-Domäne gefunden wobei diese, wie bereits erwähnt, auch nur einen einzelnen Vertreter einer weiteren Gruppe darstellen könnte. Um einen groben Überblick über das funktionale Potential der isolierten FloA-Domänen zu erhalten, wurden aus jedem Subdomänen-Typ eine oder mehrere FloA-Domänen ausgewählt, und diese in einen Expressionsvektor umklontiert (Abb. 2.1). Dabei musste neben der Art der Subdomäne in den anschließenden Adhäsions-Tests auch der Einfluss der jeweiligen PA14-Domäne berücksichtigt werden. Deutlich wird dies am Beispiel von Flo1A_{K12}, Flo1A_{Σ1278b}, und Flo5A_{Σ1278b/Σ288c}. Obwohl in allen drei FloA-Domänen die gleiche Subdomäne vorhanden ist, weist Flo1A_{K12} sowohl sequenziell als auch von seiner Flokkulationsrate her größere Ähnlichkeiten zu Flo1A_{Σ1278b} auf (Abb. 2.21a+b, Abb. 2.23).

Im Flokkulationstest wurden die höchsten Flokkulationsraten für die Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen fast ausschließlich bei den Domänen der Laborstämme gemessen, bis auf Flo1A_{K12}. Dass Flo1A_{K12} von allen zu testenden FloA-Domänen die höchste Flokkulationsrate aufwies scheint seinerseits nicht darauf zu beruhen, dass es sich um ein klinisches Isolat handelt, sondern eine eher individuelle Eigenschaft dieses Stammes zu sein da Flo1A_{K14} deutlich schwächer flokkulierte (Abb. 2.23). Wie zuvor bei den Laborstämmen zeigten sich auch bei dem Stamm K12 deutliche Unterschiede im Flokkulationsverhalten seiner Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen (Abb. 2.26). Zudem wies im Gegensatz zu den Laborstämmen

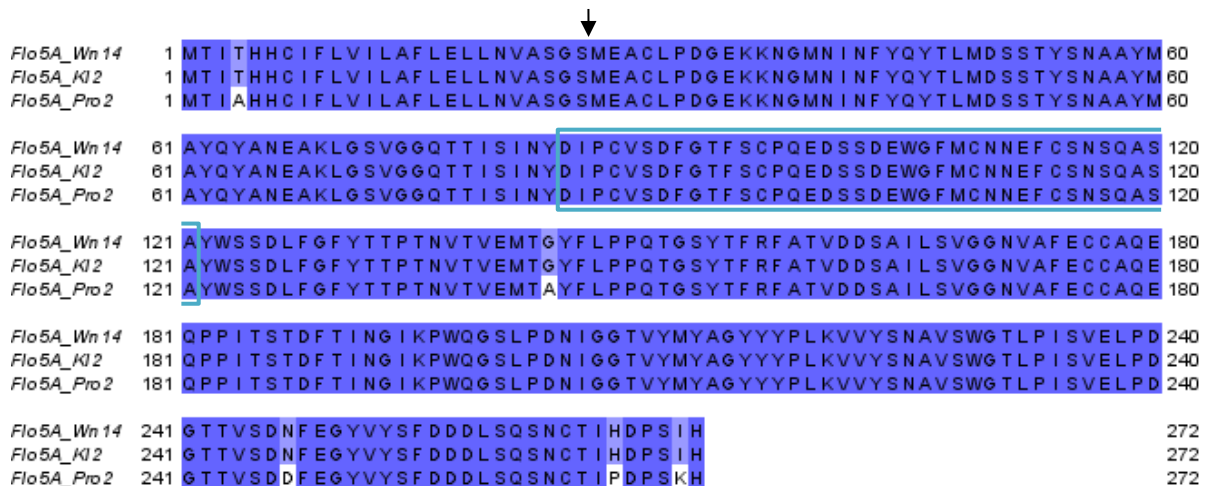
Flo1A_{K12} die stärkste Flokkulation auf, gefolgt von Flo5A_{K12} und Flo9A_{K12}, welche etwa gleich stark flokkulierten. Dabei sind in allen drei Domänen die für die Bindung von α -1,2-Mannobiose benötigten Aminosäuren gleichermaßen vorhanden (Abb. 2.21a+b, Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Zusammenfassung der *in vivo* Testergebnisse von FloA-Domänen, welche aus *Saccharomyces*-Stämmen von unterschiedlicher Herkunft isoliert wurden (übernommen aus der Masterarbeit von Eva Ackermann). Darüber hinaus sind die vorhandenen Aminosäuren an den Positionen 98, 117, und 227 angegeben, welche am Beispiel von Flo5A direkt an der Bindung von dessen bevorzugten Liganden α -1,2-Mannobiose beteiligt sind. Auch die Anwesenheit des DcisD-Motivs, welches zur Komplexierung eines Ca²⁺-Ions in der primären Bindetasche und zur Bindung des ersten Mannose-Restes benötigt wird, wurde überprüft. +++ = starke Adhäsion, ++ = mittelstarke Adhäsion, + = schwache Adhäsion, - = keine Adhäsion nachweisbar.

Flokkulin A-Domäne	Maximale Zell-Zell Adhäsion	Agar-Adhäsion	Aminosäure-Seitenketten für Ligandenspezifität			
			Q98	Q117	DcisD	S227
Flo1A _{Σ1278b}	++	+	Q	Q	DD	S
Flo1A _{Wn17}	-	-	Q	Q	DD	S
Flo1A _{Wn18}	-	+	Q	Q	DD	S
Flo1A _{K12}	++	++	Q	Q	DD	S
Flo1A _{K14}	+	++	Q	P	DD	A
Flo1A _{Br1}	-	++	Q	Q	DD	S
Flo5A _{Σ1278b/S288c}	+++	-	Q	Q	DD	S
Flo5A _{Wn14}	+	-	Q	Q	DD	S
Flo5A _{Wn15}	-	-	Q	K	DD	S
Flo5A _{K12}	+	-	Q	Q	DD	S
Flo5A _{K13}	+	-	Q	Q	DD	S
Flo5A _{K111}	-	-	Q	P	DD	A
Flo5A _{Br3}	-	-	N	fehlt	DD	A
Flo5A _{Pro2}	-	-	Q	Q	DD	S
Flo9A _{S288c}	++	-	Q	P	DD	A
Flo9A _{Wn20}	+	++	Q	Q	DD	S
Flo9A _{K12}	+	++	Q	Q	DD	S
Flo9A _{Br1}	+	++	Q	Q	DD	S

Allerdings unterscheiden sich die Flo1A_{K12}-, Flo5A_{K12}-, und die Flo9A_{K12}-Domäne sowohl in ihrer Subdomäne als auch in ihrer PA14-Domäne voneinander wodurch es anhand dieses Beispiels schwierig ist, funktionale Unterschiede mit Unterschieden in den entsprechenden Proteinsequenzen korrelieren zu können.

Dagegen warfen zwei andere Beispiele, bei denen sich die Flokkulationsraten zwischen einzelnen FloA-Domänen unterscheiden obwohl die Proteinsequenzen zum größten Teil übereinstimmen die Frage auf, ob es durch das verwendete Expressionssystem teilweise zu Limitationen in der experimentellen Anwendung kommen könnte. In diesen beiden Fällen wurden sequentielle Unterschiede insbesondere im N- und C-terminalen Bereich festgestellt (Abb. 3.9 und 3.10).



<i>Flo5A_Wn14</i>	1	MTITTHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSSSTYSNAAYM	60
<i>Flo5A_K12</i>	1	MTITTHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSSSTYSNAAYM	60
<i>Flo5A_Pro2</i>	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSSSTYSNAAYM	60
<i>Flo5A_Wn14</i>	61	AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWGFMCNNEFCSNSQAS	120
<i>Flo5A_K12</i>	61	AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWGFMCNNEFCSNSQAS	120
<i>Flo5A_Pro2</i>	61	AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSDEWGFMCNNEFCSNSQAS	120
<i>Flo5A_Wn14</i>	121	AYWSSDLFGFYTTPTNVTVEMTG YFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGNVAFECCAQE	180
<i>Flo5A_K12</i>	121	AYWSSDLFGFYTTPTNVTVEMTG YFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGNVAFECCAQE	180
<i>Flo5A_Pro2</i>	121	AYWSSDLFGFYTTPTNVTVEMTAYFLPPQTGSYTFRFATVDDSAILSVGGNVAFECCAQE	180
<i>Flo5A_Wn14</i>	181	QPPITSTDFTINGIKPWQGS LPDNIGGTVYMYAGYYYPLKVVYSNAVSWGTLPI SVELPD	240
<i>Flo5A_K12</i>	181	QPPITSTDFTINGIKPWQGS LPDNIGGTVYMYAGYYYPLKVVYSNAVSWGTLPI SVELPD	240
<i>Flo5A_Pro2</i>	181	QPPITSTDFTINGIKPWQGS LPDNIGGTVYMYAGYYYPLKVVYSNAVSWGTLPI SVELPD	240
<i>Flo5A_Wn14</i>	241	GTTVSDNFEGYVVSFDDDL S QSNCTI HDPSIH	272
<i>Flo5A_K12</i>	241	GTTVSDNFEGYVVSFDDDL S QSNCTI HDPSIH	272
<i>Flo5A_Pro2</i>	241	GTTVSDDFEGYVVSFDDDL S QSNCTI PDPSKH	272

Abb. 3.9: Vergleich von verschiedenen FloA-Domänen mit hoher Sequenzübereinstimmung, aber unterschiedlichen Flokkulationsraten. Dabei betrug die Flokkulationsrate von Flo5A_{Wn14} 52 %, von Flo5A_{K12} 43 %, und von Flo5A_{Pro2} 9 %. Bei diesem Vergleich wurden die größten Unterschiede zwischen den beiden Flokkulations-vermittelnden Domänen Flo5A_{Wn14} und Flo5A_{K12}, und der nicht-funktionalen Domäne Flo5A_{Pro2}, im C-terminalen Bereich der FloA-Domänen gefunden.

Da diese Bereiche am Übergang von der FloA-Domäne zur Flo11B-Domäne lokalisiert sind besteht die Möglichkeit, dass es zu ungünstigen Wechselwirkungen zwischen der jeweiligen FloA-Domäne und der Flo11B-Domäne kommt, sodass beispielsweise die FloA-Domäne „abknickt“ und nicht optimal außerhalb der Zellwand präsentiert werden kann. Dagegen spricht aber der erfolgreiche fluoreszenzmikroskopische Nachweis der FloA-Domänen in der Zellwand von *S. cerevisiae* (Abb. 2.22).

↓

Flo1A _{Wn17}	1	MTMPHRYMF LAVFTLLAL INVASGATEACLPAGQRKSGMN I NFYQYSLKDSSTYSNAAYM	60
Flo1A _{Br1}	1	MTMPHRYMF LAVFTLLAL INVASGATEACLPAGQRKSGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM	60
Flo9A _{K12}	1	MSLAHYCLLLA IVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM	60
Flo1A _{Wn17}	61	AYQYADKVKLGSVSGQTD IS INYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo1A _{Br1}	61	AYQYADKVKLGSVSGQTD IS INYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo9A _{K12}	61	AYQYADKVKLGSVSGQTD IS INYNLPCVTTSGTYQCPQEDAYGNWGCRCGKGRCSNSQAVS	120
Flo1A _{Wn17}	121	YWSTDLFEGFYTTPTNITLE I TGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A _{Br1}	121	YWSTDLFEGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo9A _{K12}	121	YWSTDLFEGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF SFATVDDSAILSVGGSI AFECCAQEQ	180
Flo1A _{Wn17}	181	PPITSTNFTING IKPWHGSLPDNI AGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPI SVTLPDG	240
Flo1A _{Br1}	181	PPITSTNFTING IKPWHGSLPDNI AGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPI SVTLPDG	240
Flo9A _{K12}	181	PPITSTNFTING IKPWHGSLPDNI AGTVYMYAGFYYPMKIVYSNAVSWGTLPI SVTLPDG	240
Flo1A _{Wn17}	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQS NCTIPDPSNY	271
Flo1A _{Br1}	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo9A _{K12}	241	TTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271

Abb. 3.10: Vergleich von verschiedenen FloA-Domänen mit hoher Sequenzübereinstimmung, aber unterschiedlichen Flokkulationsraten. Dabei betrug die Flokkulationsrate von Flo1A_{Wn17} 7 %, von Flo1A_{Br1} 10 %, und von Flo9A_{K12} 44 %. Bei diesem Vergleich wurden die größten Unterschiede zwischen der Flokkulations-vermittelnden Domäne Flo9A_{K12} und den Domänen welche keine Flokkulation vermitteln, Flo1A_{Wn17} und Flo1A_{Br1}, im N-terminalen Bereich der FloA-Domänen gefunden.

Insgesamt konnte mit Hilfe der FloA-Domänen aus verschiedenen *Saccharomyces*-Stämmen im Flokkulationstest gezeigt werden dass, wie schon anhand der FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c angedeutet (Abschnitt 3.1.1), die an der Bindung des Liganden α -1,2-Mannobiose beteiligten Aminosäuren teilweise variabel sind. Davon sind Q98 und das DcisD-Motiv invariabel, Serin (S) 227 gegenüber Alanin (A), und Glutamin (Q) 117 gegenüber Lysin (K) oder Prolin (P) variabel (Abb. 2.21a+b, Tab. 3.1). Darüber hinaus konnte gegenüber den Laborstämmen in diesen erweiterten funktionalen Tests nachgewiesen werden, dass die Art der genannten variablen Aminosäuren nicht ausschlaggebend für die Flokkulationsrate ist, da beispielsweise Flo1A_{K14}, Flo5A_{K111}, und Flo9A_{S288c} jeweils unterschiedliche Flokkulationsraten aufweisen obwohl sie an den entsprechenden Positionen die gleichen Aminosäuren enthalten.

Als nächstes konnte am Beispiel der Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen aus dem *Saccharomyces*-Stamm K12 gezeigt werden dass Flo5A, wie es in den Laborstämmen Σ 1278b und S288c der Fall war, nicht in jedem *Saccharomyces*-Stamm das Flokkulin ist, welches am stärksten Zell-Zell Adhäsion vermittelt (Abb. 2.26). Da eine Klassifizierung nach dem Beispiel der FloA-Domänen aus den Laborstämmen aber vermutlich ohnehin nicht zureichend ist, wie die Identifizierung einzelner Subdomänen in verschiedenen FloA-Typen belegt (Abschnitt 2.4.3.1), ist dieses Ergebnis nur teilweise überraschend. Darüber hinaus waren die Flokkulationsraten aller getesteten Flo1A-, Flo5A-, und Flo9A-Domänen im Vergleich zu

denen der Referenzdomänen aus den Laborstämmen $\Sigma 1278b$ und S288c fast immer niedriger was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei der vergleichsweise starken Flokkulation der Laborstämme um eine konservierte Eigenschaft handelt (Abb. 2.23-2.25). Außerhalb des Labors scheint die Zell-Zell Adhäsion dagegen eine weniger große Rolle zu spielen.

3.3.4.2 Die Agar-Adhäsionseigenschaften einiger neu isolierter FloA-Domänen unterstützen die Theorie zur Bindung eines bisher unbekannten Liganden

Im Gegensatz zur Zell-Zell Adhäsion wiesen die getesteten Flo1A- und Flo9A-Domänen beim Agar-Adhäsionstest im Vergleich zu den Referenzdomänen eine deutlich stärkere Adhäsion auf, wonach die Adhäsion an zellfremde Oberflächen außerhalb des Labors eine größere Rolle spielen könnte als die Zell-Zell Adhäsion (Abb. 2.27a, Abb. 2.28). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend versucht, anhand eines Vergleichs der FloA-Proteinsequenzen Unterschiede zu finden, welche einheitlich in allen adhärierenden und nicht-adhärierenden Domänen zu finden sind. Nachdem solche Unterschiede nicht gefunden werden konnten stellte sich die Frage, ob es sich stattdessen um einen möglichen kombinatorischen Effekt einzelner Aminosäuren oder Bereiche innerhalb der FloA-Domänen handelt. Tatsächlich konnten zwei Beispiele gefunden werden, bei denen es zwischen jeweils zwei FloA-Domänen starke Unterschiede im Agar-Adhäsionsverhalten gibt, welche sich aber kaum in ihrer Proteinsequenz voneinander unterscheiden.

Als erstes Beispiel dient der Vergleich zwischen den Domänen Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ und Flo1A $_{KI2}$. Während Flo1A $_{\Sigma 1278b}$ nur schwach an Agar adhärieren konnte, wies Flo1A $_{KI2}$ eine deutlich stärkere Adhäsion auf (Abb. 2.27a). Beide Domänen unterscheiden sich durch nur zwei Aminosäuren voneinander (rosa umrandet in Abb. 3.11b). Am Beispiel der Struktur von Flo5A wurde ersichtlich, dass sich die entsprechenden Aminosäuren in einer Schleife nahe des DcisD-Motivs und der primären Bindetasche befinden (rosa markierter Bereich in Abb. 3.12, siehe auch Abschnitt 3.1.2 und 3.2.1). Das zweite Beispiel ist der Vergleich zwischen den Domänen Flo1A $_{Br1}$ und Flo1A $_{Wn17}$ (Abb. 3.11a+b). Während Flo1A $_{Br1}$ eine starke Adhäsion an Agar vermittelt, konnte für Flo1A $_{Wn17}$ keine Agar-Adhäsion nachgewiesen werden (Abb. 2.27a). Beide Proteinsequenzen unterscheiden sich an nur fünf Positionen voneinander, von denen eine ebenfalls in einer Schleife nahe des DcisD-Motivs lokalisiert ist (rot umrandet in Abb. 3.11a, rot markierter Bereich in Abb. 3.12).

Agar-Adhäsion			
Flo1A_Sigma 1278b	+	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo1A_KJ2	++	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo1A_Wn18	+	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo1A_KJ4	++	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALTSVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo9A_KJ2	++	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM60
Flo9A_Wn20	++	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM60
Flo9A_Br1	++	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM60
Flo1A_Br1	++	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo10A_Sigma 1278b/S288c	++	1	MPVAARYIFLTGLFLLSVANVALGTEACLPAGEKKNGMTINIFYQYSLKDSSTYSNPSYM60
Flo5A_Wn14	-	1	MTITHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM60
Flo5A_KJ2	-	1	MTITHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM60
Flo5A_Pro2	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM60
Flo5A_Wn15	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSMEACLPDGEKKNGMNIIFYQYTLMDSTYSNAAYM60
Flo5A_KJ3	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSTQACLPVGPGRKNGMNVNFYKYSLLDSSTYSNAAYM60
Flo1A_S288c	-	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALTSVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo1A_Wn17	-	1	MTMPHRYMFLAVFTLLALINVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo9A_Sigma 1278b	-	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLANVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLMDSSTYSNAAYM60
Flo9A_S288c	-	1	MSLAHYCLLLAIVTLLGLTNVVSATTAACLPANSRKNGMNVNFYQYSLRDSSTYSNAAYM60
Flo5A_Sigma 1278b/S288c	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGATEACLPAGQRKSGMNIIFYQYSLKDSSTYSNAAYM60
Flo5A_KJ11	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGAKACLPNSRKNGMNIIFYQYSLKDSFTYSNAAYM60
Flo5A_Br3	-	1	MTIAHHCIFLVILAFLELLNVASGSTQACLPVGSRKNGMNVNFYKYSLLDSTTYSNPQYM60
Flo1A_Sigma 1278b	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDSYG.....NWG.....106
Flo1A_KJ2	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDSYG.....NWG.....106
Flo1A_Wn18	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDSYG.....NWG.....106
Flo1A_KJ4	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDLYGNG.....NWG.....106
Flo9A_KJ2	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDAYG.....NWG.....106
Flo9A_Wn20	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDAYD.....NGR.....106
Flo9A_Br1	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDVYG.....NWG.....106
Flo1A_Br1	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDAYG.....NWG.....106
Flo10A_Sigma 1278b/S288c	61		AYGYADAEKLGVSQGTKLSDYNI PCNGASDTCAQSDDDATEYSASQVVPVKRGV...K117
Flo5A_Wn14	61		AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSD.....EWG.....106
Flo5A_KJ2	61		AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSD.....EWG.....106
Flo5A_Pro2	61		AYQYANEAKLGSVGGQTTISINYDIPCVSDFGTFSCPQEDSSD.....EWG.....106
Flo5A_Wn15	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDKYG.....NWG.....106
Flo5A_KJ3	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDAYG.....WWG...G...K111
Flo1A_S288c	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDSYG.....NWG.....106
Flo1A_Wn17	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDAYG.....NWG.....106
Flo9A_Sigma 1278b	61		AYQYADKVKLGSVSGQTDISINYNP CVTTTSGTYQCPQEDKYG.....NWG.....106
Flo9A_S288c	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDLYG.....NWG.....106
Flo5A_Sigma 1278b/S288c	61		AYGYASKTKLGSVGGQTDISIDYNI PCVSSSGTFPCPQEDSYG.....NWG.....106
Flo5A_KJ11	61		AYGYASKTKLGSVGGQTNISINYRVP CVTTTSGTYPCPQEDLYG.....NWG.....106
Flo5A_Br3	61		AYKYSDTKLGSVSGQTHLSIYGP.....85
Flo1A_Sigma 1278b	107		CKGMGACSN.....SQGIA YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo1A_KJ2	107		CKGMGACSN.....SQGIA YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo1A_Wn18	107		CKGMGACSN.....SQGIA YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF K155
Flo1A_KJ4	109		CKGIGACSN.....NP I IAYWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF K157
Flo9A_KJ2	107		CRGKGRCSN.....SQAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo9A_Wn20	107		CRGKGRCSN.....SQAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo9A_Br1	107		CRGKGRCSN.....SQASAYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo1A_Br1	107		CRGKGRCSN.....SQAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo10A_Sigma 1278b/S288c	118		LCSDNTLLSKTEKRENDCCDQGAAYWSSDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGYTFG177
Flo5A_Wn14	107		FMCNNEFCSN.....SQASAYWSSDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF R156
Flo5A_KJ2	107		FMCNNEFCSN.....SQASAYWSSDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF R156
Flo5A_Pro2	107		FMCNNEFCSN.....SQASAYWSSDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF R156
Flo5A_Wn15	107		CRGKGRCSN.....SKAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF R155
Flo5A_KJ3	112		CRGKGRCSN.....SQAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF R161
Flo1A_S288c	107		CKGMGACSN.....SQGIA YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF K155
Flo1A_Wn17	107		CRGKGRCSN.....SQAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo9A_Sigma 1278b	107		CRGKGRCSN.....SKAVSYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo9A_S288c	107		CKGIGACSN.....NP I IAYWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF K155
Flo5A_Sigma 1278b/S288c	107		CKGMGACSN.....SQGIA YWSTD LFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo5A_KJ11	107		CKGIGACSN.....NP I IAYWSTD LFGFYTTPTNITLEMTGYFLPPQTGSYTF S155
Flo5A_Br3	88		NTAFWN.....TASWSSDLFGFYTTPTNVTLEMTGYFLPPQTGSYTF K128

Abb. 3.11a: Proteinsequenzen aller FloA-Domänen, welche auf ihre Agar-Adhäsion hin getestet wurden. Der schwarze Pfeil gibt den Beginn der A-Domäne nach der Signalsequenz an. Die blaue Umrandung gibt den Bereich der Subdomäne an. Adhärierende und nicht-adhärierende FloA-Domänen sind durch die schwarze Linie voneinander getrennt. Der sequentielle Unterschied zwischen den Domänen Flo1A_{Br1} und Flo1A_{Wn17}, welcher sich in der Nähe der primären Bindetasche befindet, ist rot umrandet.

Flo1A_Sigma1278b	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAGTVVYMYAGFY	215
Flo1A_K12	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGCLPHNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo1A_Wn18	156	FATVDDSAILSVGGAT	AFDCCAQQPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNVEGTVYMYAGFY	215
Flo1A_K14	158	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTISGIKQWNEPSPDNITGTVYMYAGFY	217
Flo9A_K12	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo9A_Wn20	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo9A_Br1	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo1A_Br1	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo10A_Sigma1278b/S288c	178	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCKDEQPPITSTDFTINGIKPWNADAPT	237
Flo5A_Wn14	157	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	216
Flo5A_K12	157	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	216
Flo5A_Pro2	157	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	216
Flo5A_Wn15	156	FAKVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	215
Flo5A_K13	162	FAKVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	221
Flo1A_S288c	156	FATVDDSAILSVGGAT	AFNCCAQQPPITSTNFTIDGIKPWGSLPDNIEGTVYMYAGFY	215
Flo1A_Wn17	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWHGSLPDNIAAGTVVYMYAGFY	215
Flo9A_Sigma1278b	156	FATVDDSAILSVGGNV	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWQGS	215
Flo9A_S288c	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWNGSPDNITGTVYMYAGFY	215
Flo5A_Sigma1278b/S288c	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWGSLPDNITGTVYMYAGFY	215
Flo5A_K11	156	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTNFTINGIKPWNADAPT	215
Flo5A_Br3	129	FATVDDSAILSVGGSI	AFECCAQEPPITSTDFTINGIKPWDAAPT	188
Flo1A_Sigma1278b	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo1A_K12	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo1A_Wn18	216	YPMKVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLTQSDCTIPDPSNY	271
Flo1A_K14	218	YPMKIVYSNAVAWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	273
Flo9A_K12	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo9A_Wn20	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo9A_Br1	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPEGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo1A_Br1	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo10A_Sigma1278b/S288c	238	YPIKIVYSNAVSWGTLPI	SVVLPDGTENVDDFEGYVYSFDDDNATQAHCSVPNPAEH	293
Flo5A_Wn14	217	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDNFEGYVYSFDDDLQSNCTIHDPSTH	272
Flo5A_K12	217	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDNFEGYVYSFDDDLQSNCTIHDPSTH	272
Flo5A_Pro2	217	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSKH	272
Flo5A_Wn15	216	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSKH	271
Flo5A_K13	222	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSKH	277
Flo1A_S288c	216	YPMKVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTVDPSTNY	271
Flo1A_Wn17	216	YPMKIVYSNAVSWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQSNCTIPDPSNY	271
Flo9A_Sigma1278b	216	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSKH	271
Flo9A_S288c	216	YPMKIVYSNAVAWGTLPI	SVTLPDGTTVSDDFEGYVYTFDNNLSQPNCTIPDPSNY	271
Flo5A_Sigma1278b/S288c	216	YPLKVYSNAVSWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDNFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSIH	271
Flo5A_K11	216	YPIKIVYSNAVAWGTLPI	SVLPLPDGTTVSDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSNY	271
Flo5A_Br3	189	YPIKIVYSNAKALARLP	SVVLPDGTENVDDFEGYVYSFDDDLQSNCTIPDPSKH	244

Abb. 3.11b: Fortsetzung von Abb. 3.11a. Die beiden einzigen sequentiellen Unterschiede, welche zwischen den Domänen Flo1A_{Σ1278b} und Flo1A_{K12} gefunden wurden, sind rosa umrandet.

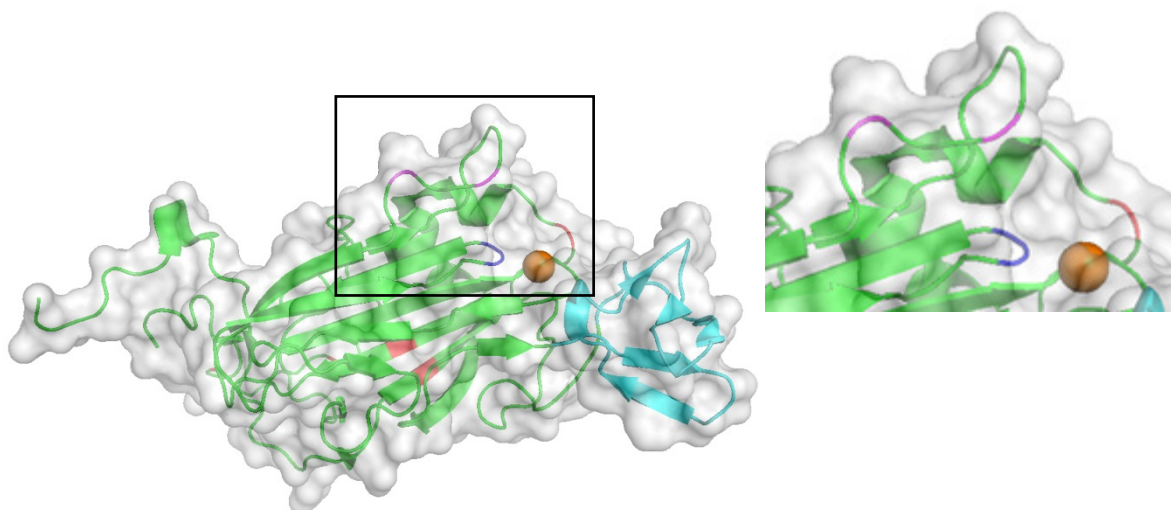


Abb. 3.12: Strukturelle Position der Aminosäuren, durch welche sich Flo1A_{Σ1278b} und Flo1A_{K12}, und Flo1A_{Br1} und Flo1A_{Wn17} voneinander unterscheiden, am Beispiel von Flo5A. Die Unterschiede zwischen Flo1A_{Σ1278b} und Flo1A_{K12} sind Rosa gekennzeichnet, während die Unterschiede zwischen Flo1A_{Br1} und Flo1A_{Wn17} Rot hinterlegt sind. Das DcsD-Motiv ist in Blau hervorgehoben. Die orangene Kugel stellt das Ca²⁺-Ion innerhalb der primären Bindetasche dar. (Flo5A PDB-ID 2XJS aus Veelders *et al.*, 2010).

Die Aminosäuren, welche in diesen beiden Beispielen zu funktionalen Unterschieden geführt haben, wurden anschließend in allen getesteten FloA-Domänen miteinander verglichen um eventuell Kombinationen zu finden, welche nur in Agar-adhäsiven und nicht-adhäsiven FloA-Domänen vorhanden sind. Allerdings konnten solche Kombinationen nicht gefunden werden. Nachdem aber bereits der Einfluss der Subdomäne auf die Struktur der FloA-Domäne insgesamt und auch auf die Agar-Adhäsion nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 2.2.3, 3.1.2, und 3.2.1), sind die strukturellen Kriterien welche für die Adhäsion an Agar erfüllt sein müssen vermutlich weitreichender, und nicht nur auf diese Positionen innerhalb der PA14-Domäne beschränkt.

Letztendlich führen auch die Ergebnisse des Agar-Adhäsionstests mit FloA-Domänen, welche nicht aus Laborstämmen stammen zu dem Schluss, dass es sich bei dieser Form der Adhäsion nicht hauptsächlich um einen hydrophoben Effekt handelt, sondern dass die hydrophoben Eigenschaften der Flo-Adhäsine jede Form von Adhäsion unterstützen. Stattdessen wird bei der Agar-Adhäsion die Bindung von einem oder mehreren bisher unbekannten Liganden durch verschiedene Aminosäure-Seitenketten vermutet. Dafür sprechen bisher insbesondere die erwähnten Vergleiche zwischen jeweils zwei FloA-Domänen, welche sich in ihrer Adhäsion an Agar stark voneinander unterscheiden, während die sequenziellen Unterschiede so gering sind dass sie die Hydrophobizität nicht wesentlich beeinflussen können.

3.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals die Funktion verschiedener FloA-Domänen in einem ansonsten einheitlichen Expressionssystem gemessen und miteinander verglichen werden. Dabei wiesen die Domänen sowohl sequentiell als auch von ihren adhäsiven Eigenschaften her eine hohe Diversität auf. Um die Analyse weiterzuführen wären darüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer *Saccharomyces*-Stämme sowie deren Genomsequenzen verfügbar, welche direkt für Sequenzvergleiche genutzt werden könnten. Von Liti *et al.* (2009) wurden zum Beispiel *S. cerevisiae*- und *S. paradoxus*-Stämme aus verschiedenen Quellen weltweit bezogen und phylogenomisch miteinander verglichen. Von Strobe *et al.* (2015) wurden zudem die Genome von 93 *S. cerevisiae*-Stämmen sequenziert, welche ebenfalls aus verschiedenen geographischen und ökologischen Quellen stammen. Was jedoch noch nicht beantwortet wurde ist die Frage, inwiefern die entsprechenden Flokkuline in ihrer

ursprünglichen Domänenzusammensetzung Adhäsion vermitteln können, da beispielsweise Längenvariationen in der mittleren B-Domäne zu funktionalen Unterschieden führen (Verstrepen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Auch wurde noch nicht untersucht, ob und unter welchen Bedingungen die entsprechenden *FLO*-Gene in den einzelnen *Saccharomyces*-Stämmen überhaupt exprimiert werden. Demnach stellen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zunächst ein Abbild eines potentiell vorhandenen Repertoires an Adhäsionseigenschaften durch die PA14-artigen FloA-Domänen dar.

Eine weitere, konkrete Frage welche bislang noch offen bleibt, ist die Art des bei der Agar-Adhäsion gebundenen Liganden. Diese Fragestellung könnte zudem einen ersten Hinweis darauf liefern, dass das Ligandenspektrum der PA14-artigen FloA-Domänen noch weitreichender ist als bisher bekannt. Angesichts der vielen ökologischen Nischen welche von *Saccharomyces* besiedelt sind (siehe Abschnitt 2.4), scheint dies plausibel zu sein. Nachdem *S. cerevisiae* darüber hinaus als opportunistisch pathogener Organismus eingestuft ist wäre es hilfreich, weitere Liganden zu identifizieren, um daraus mögliche Therapieansätze ableiten zu können (Murphy and Kavanagh, 1999). Ob die gewonnenen Einsichten in die Funktion der PA14-artigen FloA-Domänen biotechnologische Anwendung finden könnten bleibt dagegen offen, da beispielsweise in der Lebensmittelherstellung eher traditionell bewährte Stämme verwendet werden.

4. Material

4.1 Geräte und Programme

Tab. 4.1: Verwendete Geräte und Hersteller.

Gerät	Hersteller
CCD-Kameras „ORCA-ER-1394“ und „C9 100-02“	HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GmbH (Herrsching, DE)
Digitalkamera „Canon PowerShot A620“	CANON DEUTSCHLAND GmbH (Krefeld, DE)
DNA-Geldokumentationsanlage „GelDoc™ XR + System“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, DE)
Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager A1“	CARL ZEISS AG (Oberkochen, DE)
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	CARL ZEISS AG (Oberkochen, DE)
Fluoreszenzmikroskop „Axio Observer.Z1“	CARL ZEISS AG (Oberkochen, DE)
Fraktionskollektor „Frac-920“	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (Chalfont St Giles, UK)
French Pressure Cell Press	AMERICAN INSTRUMENT COMPANY, DIVISION OF TRAVENOL LABORATORIES Inc. (Silver Spring, MD, USA)
Gelelektrophoreseapparaturen für Agarose- und SDS-Gele	BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, DE) sowie Elektronikwerkstatt der Philipps-Universität Marburg
IKA® Vibrax VXR basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, DE)
Kühlfälle „CT 02-50“	MARTIN CHRIST GEFRIERTROCKNUNGSANLAGEN GmbH (Osterode am Harz, DE)
Membran-Vacuumpumpe „MZ 2C“	VACUUBRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, DE)

Gerät	Hersteller
Multiband-Transilluminator 312/365 nm-IL-20-M/L	H. SAUR LABORBEDARF (Reutlingen, DE)
PCR-Gerät „Primus 25 advanced“	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH (Erlangen, DE)
PCR-Gerät „TProfessional Basic Gradient“	ANALYTIK JENA AG (Jena, DE)
Peristaltikpumpe „Pump P-1“	PHARMACIA BIOTECH (Uppsala, SE)
Photometer „Biochrom WPA CO8000“	BIOCHROM Ltd. (Cambridge, UK)
pH-Meter „S20 Seven Easy™ pH“	METTLER TOLEDO Inc. (Greifensee, CH)
Pipetten	GILSON Inc. (Middleton, WI, USA)
PowerPac™ Basic Power Supply	BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, DE)
Spektrofluorometer „FP-6500“	JASCO Inc. (Easton, MD, USA)
Spektrophotometer „Nano-Drop ND-1000“	THERMO FISCHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
Standzentrifuge mit Kühlung „Sigma 4K15“	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH (Osterode, DE)
Standzentrifuge mit Kühlung „Heraeus® Megafuge® 1.0 R“	HERAEUS INSTRUMENTS GmbH (Hanau, DE)
Standzentrifuge mit Kühlung „Sorvall RC 5B Plus“	THERMO FISCHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
Temperierbarer Inkubationsschüttler „Multitron Pro“	INFORS GmbH (Einsbach, DE)
Tisch-Zentrifugen „Heraeus® Biofuge® fresco“ und „Heraeus® Biofuge® pico“	HERAEUS HOLDING GmbH (Hanau, DE)
Ultrazentrifuge „Beckman L7-65“	BECKMAN COULTER Inc. (Brea, CA, USA)
ÄKTApurifier UPC 10	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (Chalfont St Giles, UK)

Tab. 4.2: Verwendete Programme, sowie deren Verwendungszweck.

Program	Anbieter	Anwendung
Clone Manager Basic 9	SCI-ED SOFTWARE	Erstellen von Plasmidkarten, Bearbeiten von Sequenzen, Primerdesign
ClustalX2	(Larkin <i>et al.</i> , 2007)	Vergleich von Sequenzen
Dendroscope Version 2.7.4	(Huson <i>et al.</i> , 2007)	Darstellung von phylogenetischen Stammbäumen
ExPASy Prot Param tool	web.expasy.org/protparam/ Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)	Berechnung des Molekulargewichts und des Extinktionskoeffizienten von Protein A-Domänen
GraphPad Prism 5	GRAPH PAD SOFTWARE	Erstellen und Bearbeiten von grafischen Darstellungen
Image J	Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2014.	Bearbeiten von Mikroskopie- und Kamerabildern
Inkscape	www.inkscape.org	Erstellen von zeichnerischen Abbildungen
Jalview	www.jalview.org	Bearbeiten von Sequenzvergleichen
PyMOL	www.pymol.org	Darstellung von 3D- Proteinstrukturen, Erstellen von Abbildungen
SeaView Version 4	http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview (Gouy <i>et al.</i> , 2010)	Erstellen von phylogenetischen Stammbäumen
Volocity Demo	PERKIN ELMER	Speichern und Exportieren von Mikroskopiebildern

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4.3: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Material	Hersteller
Amicon [®] Ultra-4, Amicon [®] Ultra-15 Zentrifugalfilter	MERCK KGaA (Darmstadt, DE)
Impfeschlinge 1 µl, weiß Impfeschlinge 10 µl blau	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, DE)
Omnifix [®] Einmalspritzen, mit Luer- Anschluss, 5 ml	B. BRAUN MELSUNGEN AG (Melsungen, DE)
Omnifix [®] -F 1 ml Feindosierungsspritzen	B. BRAUN MELSUNGEN AG (Melsungen, DE)
Rotilabo [®] -Spritzenfilter, CME, steril, 0,22 µm	CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Sterican [®] Standardkanülen Gr.17	B. BRAUN MELSUNGEN AG (Melsungen, DE)
Steritop [™] Flaschenaufsatzfilter, 150 ml	MERCK KGaA (Darmstadt, DE)
UFC30GV25/Ultrafree [®] -MC Centrifugal Filters	MERCK KGaA (Darmstadt, DE)
Ni Sepharose [™] High Performance	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (Chalfont St Giles, UK)

4.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE), SIGMA-ALDRICH Co. (St.Louis, MO, USA), QIAGEN N.V. (Venlo, NL) und DEXTRA LABORATORIES Ltd. (Reading, UK) bezogen.

4.4 Enzyme, Größenstandards und Kits

Tab. 4.4: Verwendete Enzyme und Größenstandards, sowie Kits und deren Hersteller.

Enzym, Größenstandard, Kit	Hersteller
DNaseI	APPLICHEM GmbH (Darmstadt, DE)
E.Z.N.A. [®] Gel Extraction Kit	OMEGA BIO-TEC Inc. (Norcross, GA, USA)
E.Z.N.A. [®] Plasmid DNA Mini Kit I	OMEGA BIO-TEC Inc. (Norcross, GA, USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
Restriktionsendonukleasen	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
T4 DNA-Ligase	ROCHE DIAGNOSTICS DEUTSCHLAND GmbH (Mannheim, DE)
T4 DNA-Ligase	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (50)	QIAGEN N.V. (Venlo, NL)

4.5 Puffer und Nährmedien

In Tab. 4.5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, sowie deren jeweiliger Verwendungszweck aufgeführt. Für die Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden die Medien laut Tab. 4.6 verwendet, wobei bei festem Medium zusätzlich die Zugabe von 2 % (w/v) Agar erfolgte. In Antibiotika-haltigen Medien wurden diese erst nach dem Autoklavieren des Mediums hinzugefügt.

Tab. 4.5: Übersicht über alle verwendeten Puffer und weitere Lösungen, und deren jeweiliger Verwendungszweck.

Puffer	Zusammensetzung	Verwendungszweck
AM-Puffer	20 mM Tris 200 mM NaCl Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt.	Proteinaufreinigung
AM-Puffer +15 mM Imidazol	Siehe AM-Puffer. 15 mM Imidazol	Spülen der NiNTA-Säule nach Auftragung des Proteins
AM-Puffer +500 mM Imidazol	Siehe AM-Puffer. 500 mM Imidazol	Elution des gebundenen Proteins innerhalb eines Gradienten
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie-Blau 5 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Ethanol	Einfärben von Proteinbanden nach SDS-PAGE
Entfärbelösung	5 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Isopropanol	Entfärben von SDS- Gelen
Flo10A ^{SSD} - Kristallisationspuffer	20 mM Tris 100 mM NaCl Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt.	Puffer für Flo10A ^{SSD} welches für Kristallisation eingesetzt wurde
Flo10A-Kristallisationspuffer	20 mM Tris 100 mM NaCl Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt. 5 mM Mannose	Puffer für Flo10A welches für Kristallisation eingesetzt wurde
Flo10A-Vorbereitungspuffer	20 mM Tris 100 mM NaCl Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt. 0,8 M Mannose	Puffer zur Vorbereitung von Flo10A für Kristallisation zusammen mit Mannose

Puffer	Zusammensetzung	Verwendungszweck
HU-Puffer	8 M Urea 5 % (w/v) SDS 0,2 M NaH ₂ PO ₄ pH 6,8 0,1 mM EDTA 0,1 % (w/v) Bromphenolblau Zugabe von 15 mg/ml DTT.	Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	0,025 M Tris 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS	SDS-Gelelektrophorese
6×Loading Dye	10 mM Tris-HCl pH 7,6 0.03 % (w/v) Bromophenolblau 0.03 % (w/v) Xylene Cyanol FF 0.15 % (w/v) Orange G 60 % (w/v) Glycerin 60 mM EDTA pH 8,0	Probenvorbereitung für Gelelektrophorese
Lysepuffer	2 % (w/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA	Isolation von <i>S. cerevisiae</i> genomischer DNA
PEG-Lösung	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0 40 % (w/v) PEG 4000	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen
Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline) - PBS	Je Liter: 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,78 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 0,27 g KH ₂ PO ₄ Auf pH 7,4 eingestellt. Zusätzlich Zugabe von 2 % (w/v) BSA.	Vorbereitung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen für Fluoreszenzmikroskopie

Puffer	Zusammensetzung	Verwendungszweck
Phosphatpuffer	0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 5,2	Messungen am Spektrofluorometer
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ ·4 H ₂ O 30 mM KOAc 10 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O 15 % (w/v) Glycerin Mit 10%-iger Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O 15 % (w/v) Glycerin Mit 10%-iger Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert.	
SORB-Lösung	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA/NaOH pH 8,0 1 M Sorbitol Mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt.	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen
TAE-Puffer	Je Liter: 242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 18,61 g EDTA	Agarosegele und Laufpuffer für Agarose- Gelelektrophorese
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA	Isolation von <i>S. cerevisiae</i> genomischer DNA

Tab. 4.6: Für die Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* verwendete Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung
Aminosäuremischung	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Je 2 g L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Isoleucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin, Adenin ❖ 0,2 g p-Aminobenzoat
LB („Lysogeny Broth“)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1% NaCl
SC-4 („Synthetic Complete“, ohne Uracil, L-Histidin, L-Leucin und L-Tryptophan)	0,15 % (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base (w/o aa & as) 0,5 % (w/v) NH ₄ SO ₄ 2mM Meso-Inositol 0,2 % (w/v) Aminosäuremischung 2 % (w/v) Glukose
YEPD („Yeast Extract, Peptone, Dextrose“)	2 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Glukose

4.6 Polyacrylamid- und Agarosegele

Tab. 4.7: Zusammensetzung der verwendeten Gele.

Gel	Zusammensetzung
Agarose-Gel	1 % (w/v) Agarose TAE-Puffer

Gel	Zusammensetzung
SDS-Sammelgel	2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH 6,8 6,1 ml H ₂ O 1,3 ml Rotiphorese® Gel30 (CARL ROTH) 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1 100 µl 10 % (w/v) SDS 10 µl TEMED 100 µl 10 % (w/v) APS
SDS-Trenngel (10%)	3,75 ml 1M Tris-HCl pH 8,8 2,5 ml H ₂ O 3,4 ml Rotiphorese® Gel30 100 µl 10 % (w/v) SDS 5 µl TEMED 100 µl 10 % (w/v) APS

4.7 Antibiotika

Nach dem Autoklavieren der Nährmedien erfolgte ggf. die Zugabe von den in Tab. 4.8 aufgeführten Antibiotika mit einer jeweiligen Verdünnung der Stocklösungen von 1:1000.

Tab. 4.8: Antibiotika, welche den Nährmedien zugesetzt wurden.

Antibiotikum	Konzentration der Stocklösung	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Kanamycin	35 mg/ml	
Spectinomycin	12,5 mg/ml	APPLICHEM GmbH
Streptomycin	50 mg/ml	

4.8 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt, bei der die HA-markierten Proteine auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden sollten. Die Lagerung der Antikörper erfolgte beim Sekundärantikörper bei 4 °C. Der primäre Antikörper wurde zunächst mit 50 % Glycerin (Endkonzentration) versetzt, und anschließend bei -20 °C gelagert.

Tab. 4.9: Für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendete Antikörper.

Antikörper- bezeichnung	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer	Verwendungszweck
Mouse anti-HA (monoklonal)	1:1000	SIGMA-ALDRICH Co., H3663	Primärantikörper
Goat anti-Mouse (polyklonal)	1:1000	SIGMA-ALDRICH Co., C2181	Sekundärantikörper

4.9 Oligonukleotide

Mit der Synthese der Oligonukleotide wurden die beiden Firmen metabion international AG (Martinsried, DE) und Microsynth AG (Balgach, CH) beauftragt. Vor der Verwendung der Oligonukleotide wurde zunächst ein laut Hersteller entsprechendes Volumen ddH_2O hinzugegeben um eine Anfangskonzentration von 100 μM zu erreichen. Je nach Bedarf folgte eine weitere, separate Verdünnung auf 10-20 μM . Die Lagerung erfolgte jeweils bei -20 °C.

Tab. 4.10: Verwendete Oligonukleotide.

Primer	Sequenz 5'-3'
	Beschreibung und Verwendungszweck
1601-A2-SacI SacII	AAA GAG CTC CCG CGG GAA GGA GGG GGA TCC ACT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Whole-Vector PCR zur Herstellung von BHUM1760 ❖ Enthält <i>SacI</i>/<i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
Flo11-5	AAA GAG CTC ATA GAT TGT GAC AAC AAT TGT GCT CCA GTA CC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu 1601-A2-SacI SacII ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle ❖ Diplomarbeit Sandra Benthin
FLO1A_gen._fw.	CTC TTG CTC GTT TGA TGT AAG C
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung der <i>FLO1A</i>-Domäne aus <i>S. cerevisiae</i>-Stämmen
FLO1A_gen._rev.	TAG AGG TGA AAG TAC CGG TCC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO1A_gen._fw.
FLO1A_rev._SacI	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} aus YHUM0271 ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{S288c} und <i>FLO9A</i>_{S288c} aus YHUM1605 ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} aus BHUM2033 ❖ Komplementärer Primer zu FLO5-1 SacII und FLO9A_fw._SacII ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2071_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CTA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i> (YHUM2071) aus BHUM2600 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle

FLO1A_2071_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA GTT TGA AGG ATC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO1A_2071_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2075_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i> (YHUM2075) aus BHUM2603 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2075_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO1A_2075_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2077_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i> (YHUM2077) aus BHUM2605 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2077_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO1A_2077_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2087_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i> (YHUM2087) aus BHUM2614 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO1A_2087_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO1A_2087_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
LgFLO1A_rev._SacI	AAA AAA GAG CTC ATG TTT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} aus YHUM0271 ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} aus BHUM2857 ❖ Komplementärer Primer zu FLO9A_fw._SacII ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle

FLO9A_fw._SacII	AAA AAA CCG CGG ACA GCG GCA TGC CTG CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} aus YHUM0271 ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i>_{Σ288c} aus YHUM1605 ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} aus BHUM2857 ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} in BHUM2857 und <i>FLO9A</i>_{Σ1278b} in BHUM2299
FLO9A_gen._fw.	CTT CCT TCT TAT TTA CAG GTA CG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung der <i>FLO9A</i>-Domäne aus <i>S. cerevisiae</i>-Stämmen
FLO9A_gen._rev.	CAA TGA CGG TTT CGT CAG TTG G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO9A_gen._fw.
FLO9A_2073_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GCG GCA TGC CTG CCA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i> (YHUM2073) aus BHUM2524 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO9A_2073_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO9A_2073_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO9A_2075_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GCG GCA TGC CTG CCA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i> (YHUM2075) aus BHUM2248 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO9A_2075_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO9A_2075_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO9A_2087_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GCG GCA TGC CTG CCA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO9A</i> (YHUM2087) aus BHUM2522 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO9A_2087_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA AGG GTC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO9A_2087_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle

FLO5-1 SacII	AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} aus YHUM0271 ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{S288c} aus YHUM1605 ❖ Amplifizierung von <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} aus BHUM2033 ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> aus BHUM1441 und BHUM2009 ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO5A</i>^{ΔSD} in BHUM2007, <i>FLO5A</i> in BHUM2009, <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} in BHUM2033, <i>FLO1A</i>_{Σ1278b} in BHUM2298, <i>FLO1A</i>_{S288c} in BHUM2856 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5-3	AAA GAG CTC ATG TAT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5-1 SacII ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle ❖ Diplomarbeit Sandra Benthin
FLO5A-FLO10S_fw.	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO5A</i>^{ΔSD} in BHUM2853 und <i>FLO5A</i>^{10SD} in BHUM2852 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_G4S_fw.	AGA ACC ACC ACC ACC ATA ATC AAT CGA AAT ATC AGT TTG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Whole-Vector PCR ❖ 5'-terminale <i>G4S</i>-Brücke ❖ Erstellen von BHUM2007
FLO5A_G4S_rev.	TAC TGG AGT ACT GAT TTA TTT G
	❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_G4S_fw.
FLO5A-FLO10S_fw._pET	AAA AAA CAT ATG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i>^{ΔSD} aus BHUM2007 und Ligation in pET28a(+) ❖ Enthält <i>NdeI</i> Restriktionsschnittstelle

FLO5A- FLO10S_rev._pET	AAA AAA CTC GAG TTA ATG TAT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A-FLO10S_fw._pET ❖ Enthält Stopcodon und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_gen._fw.	TCT TGC TCT GCA GTA AAT TCC GC
	❖ Amplifizierung der <i>FLO5A</i> Domäne aus <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen
FLO5A_gen._rev.	GTG ATG GTG GTC ATC TCA GTG G
	❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_gen._fw.
FLO5A_2066_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ATG GAA GCA TGC CTG CCA GAT G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2066) aus BHUM2233 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2066_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATG TAT TGA AGG ATC ATG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2066_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2067_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ATG GAA GCA TGC CTG CCA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2067) aus BHUM2634 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2067_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATG TTT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2067_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2075_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ATG GAA GCA TGC CTG CCA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2075) aus BHUM2240 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle

FLO5A_2075_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATG TAT TGA AGG ATC ATG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2075_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2076_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA CAA GCA TGC CTG CCA GTG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2076) aus BHUM2640 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2076_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATG TTT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2076_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2084_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA GAG GCG TGC TTA CCA GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2084) aus BHUM2649 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2084_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA ATT TGA GGG GTC TGG AAT G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2084_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2089_SacII_fw	AAA AAA CCG CGG ACA CAA GCA TGC CTG CCA GTG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO5A</i> (YHUM2086) aus BHUM2651 und <i>FLO5A</i> (YHUM2089) aus BHUM2655 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2089_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATA CTT TGA AGG ATC TGG AAT GG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2089_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO5A_2086_SacI_rev	AAA AAA GAG CTC ATG TTT TGA AGG ATC AGG GAT AG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO5A_2089_SacII_fw ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO10A-FLO5S_fw.	AAA AAA CCG CGG CTA GGT ACT ACA G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO10A</i>^{5SD} aus BHUM1899 ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO10A</i>^{5SD} in BHUM2854 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle

FLO10A-FLO5S_rev.	AAA AAA GAG CTC ATG CTC AGC AGG G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO10A-FLO5S_fw. ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO10A_G4S_fw.	AGA ACC ACC ACC ACC ATA ATC GAT GGA AAG CTT TGT TTG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Whole-Vector PCR ❖ 5'-terminale G4S-Brücke ❖ Erstellen von BHUM2008
FLO10A_G4S_rev.	TAC TGG AGT TCA GAT CTG TTC G
	❖ Komplementärer Primer zu FLO10A_G4S_fw.
FLO10-int	GGA GGT AAT GTT GCC TTT G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer ❖ Bindet in <i>FLO10A</i>-Domäne
FLO10A_gen_fw.	ACT GTT TCG AGT TTA CGT TGA AG
	❖ Amplifizierung der <i>FLO10A</i> -Domäne aus <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen
FLO10A_gen_rev.	GAC TCG GTC TCG GTA CAC TC
	❖ Komplementärer Primer zu FLO10A_gen_fw.
FLO10 A-Domain_for_SacII	AAA AAA CCG CGG CTA GGT ACT ACA GAG GCT TG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO10A</i> aus BHUM1896 ❖ Sequenzierprimer für BHUM2008 und BHUM2300 ❖ Enthält <i>SacII</i> Restriktionsschnittstelle
FLO10 A-Domain_rev_SacI	AAA AAA GAG CTC ATG CTC AGC AGG GTT TGG AAC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO10 A-Domain_for_SacII ❖ Enthält <i>SacI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO10A-FLO5S_fw_pET	AAA AAA CAT ATG CTA GGT ACT ACA GAG GCT TG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO10A</i>^{SSD} aus BHUM1899 und Ligation in pET28a(+) ❖ Amplifizierung von <i>FLO10A</i> aus YHUM0271 und Ligation in pET28a(+) ❖ Sequenzierprimer für BHUM2036 ❖ Enthält <i>NdeI</i> Restriktionsschnittstelle

FLO10A- FLO5S_rev._pET	AAA AAA CTC GAG TTA ATG CTC AGC AGG GTT TGG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu FLO10A-FLO5S_fw._pET ❖ Enthält Stopcodon und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstelle
FLO10A_rev._pET	AAA AAA CTC GAG TTA TGA TAC ACA AGT TCT TGC ATG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Amplifizierung von <i>FLO10A</i> aus YHUM0271 und Ligation in pET28a(+) ❖ Komplementärer Primer zu FLO10A-FLO5S_fw._pET ❖ Enthält Stopcodon und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstelle
fw_FLO11_150	TTG AAG GGT TCC CAA TTG A
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer für BHUM1896, BHUM2009, BHUM2033, BHUM2857
2074_PGK- Sequenzier_for	GGT GGT TTA GTT TAG TAG AAC CTC G
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer ❖ Bindet in <i>PGK1</i>-Promotor ❖ Masterarbeit Stefanie Henkel
pJET1.2_seq._fw.	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer ❖ Bindet vor MCS in pJET1.2
pJet1.2_seq._rev.	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Komplementärer Primer zu pJET1.2_seq._fw.
FLO1A_2080_seq_fw	CCT TGA CTA TTA GAA CAA GCA C
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO1A</i> (YHUM2080) in BHUM2568
Seq._pMA-T_FLO-Sub	ACG GCC AGT GAG CGC GAC
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer für <i>FLO5A^{ASD}</i> in BHUM2007 und <i>FLO10A^{ASD}</i> in BHUM2008
T7 Promotor Primer (Novagen)	TAATACGACTCACTATAGGG
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sequenzierprimer für BHUM2036, BHUM2858, BHUM2859

4.10 Synthese von chimären *FLOA*-Domänen

Die Synthese der chimären A-Domänen *FLO5A*^{10SD} und *FLO10A*^{5SD} erfolgte durch die Geneart AG in Regensburg was den Vorteil hatte, dass keine Restriktionsschnittstellen innerhalb der A-Domänen eingeführt werden mussten. Dabei wurden die synthetisch hergestellten A-Domänen mit Hilfe von *SfiI* Restriktionsschnittstellen in den Vektor pMA-T ligiert (Tab. 4.14), sequenziert, und anschließend versandt.

4.11 Stämme und Plasmide

4.11.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 4.11: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stammname	Genotyp	Herkunft
DH5α TM	F– Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen AG
Origami TM 2	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> <i>PvuII phoR</i> <i>araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[<i>lac</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Str ^R , Tet ^R)	Novagen [®]
SHuffle [®] T7	F' <i>lac, pro, lacIQ</i> / Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>araD139</i> <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> Δ(<i>phoA</i>) <i>PvuII phoR</i> <i>ahpC* galE</i> (or U) <i>galK λatt::pNEB3-r1-</i> <i>cDsbC</i> (Spec ^R , <i>lacI</i> ^q) Δ <i>trxB rpsL150</i> (Str ^R) Δ <i>gor</i> Δ(<i>malF</i>)3	New England Biolabs [®] Inc.
Top10	F– <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen AG

4.11.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Die Stämme in Tab. 4.12 wurden für die *in vivo* Experimente mit FloA-Domänen aus den Laborstämmen Σ 1278b und S288c verwendet. Dabei wurden die *FLOA*-Domänen teilweise aus YHUM0271 (Σ 1278b) und YHUM1605 (S288c) amplifiziert. Die Plasmide mit den verschiedenen *FLOA*-Domänen wurden anschließend in den nicht-adhäsiven Σ 1278b Stamm YHUM0924 transformiert.

Tab. 4.12: *S. cerevisiae*-Stämme, welche für die *in vivo* Experimente mit verschiedenen FloA-Domänen verwendet wurden.

Stammnummer	Genotyp	Herkunft
YHUM0271	<i>MATa ura3-52 leu2::hisG</i> <i>his3::hisG trp1::hisG</i> Σ 1278b	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0924	<i>MATa ura3-52 flo11Δ::kanR</i> Σ 1278b	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1605	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1</i> <i>his3Δ200 S288c</i>	Stammsammlung AG Mösch

Für die Amplifikation der *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* A-Domänen aus verschiedenen nicht-Laborstämmen wurden die Stämme in Tab. 4.13 verwendet. Die letztendlich dadurch gewonnenen Proteinsequenzen wurden anschließend in einer phylogenetischen Analyse miteinander verglichen. Bei ausgewählten FloA-Domänen wurden außerdem funktionale Tests durchgeführt. Der sequenzielle Vergleich der Flo10A-Domänen erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Johanna Müller. Der sequenzielle, phylogenetische und funktionale Vergleich von Flo1, Flo5 und Flo9 A-Domänen wurde während der Masterarbeit von Eva Ackermann durchgeführt.

Tab. 4.13: *S. cerevisiae*-Stämme, welche zur Analyse der FloA-Variabilität verwendet wurden.

Bezeichnung	Stammnummer	Vorherige Bezeichnung	Herkunft	Bezogen von / Referenz
Wn1	YHUM2053	SIHA Cryarome	Verkaufskultur Weinherstellung	Dr. Christian von Wallbrunn, Geisenheim (DE)
Wn2	YHUM2054	SIHA 7		
Wn3	YHUM2055	SIHA white arome		
Wn4	YHUM2056	Lalvin R-HST		
Wn5	YHUM2057	Lalvin EC 1118		
Wn6	YHUM2058	uvaferm SVG		
Wn7	YHUM2059	uvaferm CEG		
Wn8	YHUM2060	uvaferm VRB		
Wn9	YHUM2061	Oenoferm Freddo		
Wn10	YHUM2062	Fermicru L 52		
Wn11	YHUM2063	10-S1-G1-Spa-11	Wildisolat aus Spontangärung	
Wn12	YHUM2064	10-S1-G1-Spa-96		
Wn13	YHUM2065	10-S1-G1-Spa-12		
Wn14	YHUM2066	CK 5 Schloss Vollrads 2004	Wildisolat aus Wein	
Wn15	YHUM2067	CK 3 Schloss Vollrads 2004		
Wn16	YHUM2068	DS 60 Geisenheimer Mäuerchen 2005		
Wn17	YHUM2070	G 74	Verkaufskultur Weinherstellung	
Wn18	YHUM2071	BS 4 Steinberg 2009	Wildisolat aus Wein	
Wn19	YHUM2072	BS 5 Steinberg 2009		
Wn20	YHUM2073	Steinberg		
Wn21	YHUM2090	11-ESA-92		
Wn22	YHUM2091	11-ESA-105		

Bezeichnung	Stammnummer	Vorherige Bezeichnung	Herkunft	Bezogen von / Referenz
Wn23	YHUM2092	11-ESA-130	Wildisolat aus Wein	Dr. Christian von Wallbrunn, Geisenheim (DE)
Wn24	YHUM2093	11-ESA-132		
Wn25	YHUM2094	11-ESA-181		
Wn26	YHUM2095	11-ESA-215		
Wn27	YHUM2069	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
K11	YHUM2074	SSI1, Zeh	Klinisches Isolat	Statens Serum Institute, Kopenhagen (DK)
K12	YHUM2075	SSI2, Nebenniere		
K13	YHUM2076	SSI6, Vagina		
K14	YHUM2077	YJM128 (CBS 7833), Lunge		Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Utrecht (NL)
K15	YHUM2078	YJM222 (CBS 7834), Mann		
K16	YHUM2079	YJM273 (CBS 7835), Bauchfell		
K17	YHUM2080	YJM308 (CBS 7836), Flüssigkeit aus Punktion		
K18	YHUM2081	YJM309 (CBS 7837), Blut		
K19	YHUM2082	YJM310 (CBS 7838), Mann		
K110	YHUM2083	YJM311 (CBS 7839), Galle		
K111	YHUM2084	YJM312 (CBS 7840), Flüssigkeit von Bauchwassersucht		
K112	YHUM2135	SSI3, Blut		
K113	YHUM2136	SSI4 (RH 7806)		

Bezeichnung	Stammnummer	Vorherige Bezeichnung	Herkunft	Bezogen von / Referenz
K114	YHUM2137	SSI5 (Hvidovre112)	Klinisches Isolat	Statens Serum Institute, Kopenhagen (DK)
K115	YHUM2138	SSI7, Vagina		
K116	YHUM2139	SSI8, Vagina		
K117	YHUM2140	SSI9, Vagina		
Br1	YHUM2087	A6, Hirsebier	Isolat aus der Hirsebier- herstellung	Ghana (van der Aa Kühle <i>et al.</i> , 2001)
Br2	YHUM2088	A18, Hirsebier		
Br3	YHUM2089	KVL012	Stamm aus der Ale Bier Herstellung	Jespersen <i>et al.</i> , 1999
Br4	YHUM2142	56, Dänischer Blauschimmel- käse	Isolat aus Dänischem Blauschimmel- käse	Hansen and Jakobsen, 2001
Br5	YHUM2143	D7, Gorgonzola	Gorgonzola, Italien	Italien (van der Aa Kühle <i>et al.</i> , 2005)
Br6	YHUM2144	C1, Hirsebier	Isolat aus der Hirsebier- herstellung	Burkina Faso (van der Aa Kühle <i>et al.</i> , 2001)
Pro1	YHUM2085	Precosa [®] , batch 259, <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Probiotischer Stamm	Logic aps., Lyngø (DK) (van der Aa Kühle and Jespersen, 2003)

Bezeichnung	Stammnummer	Vorherige Bezeichnung	Herkunft	Bezogen von / Referenz
Pro2	YHUM2086	Levucell® SB, Futtermittelzusatz, <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Probiotischer Stamm	Euro Tier, Niederzissen (DE) (van der Aa Kühle and Jespersen, 2003)
Pro3	YHUM2141	Ultra-Levure, batch 7103, <i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>		Laboratoires Biocodex, Montrouge (Fr) (van der Aa Kühle and Jespersen, 2003)

4.11.3 Plasmide

Tab. 4.14: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
B2445	YCplac33 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>ΔFLO</i> Negativkontrolle für <i>in vivo</i> Experimente	Gietz and Sugino, 1988
BHUM1424	pJET1.2 mit <i>DON1</i> Fragment <i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> pJET1.2 mit <i>EcoRV</i> -Fragment von <i>DON1</i> aus <i>U. maydis</i> .	Stammsammlung AG Mösch, Thermo Fisher Scientific Inc.
BHUM1441	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5</i> _{Σ1278b} in B2445	Diplomarbeit Sandra Benthin

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM1514	<i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator <i>FLO5A</i> _{Σ1278b} (AS23-271) aus RH2754 in pET28a(+).	Veelders <i>et al.</i> , 2010
BHUM1593	pET28a(+) <i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator	Novagen [®]
BHUM1601	<i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO11</i> _{Σ1278b} aus WY423 in BHUM0778.	Maestre-Reyna <i>et al.</i> , 2012
BHUM1760	BHUM1601 1601-A2 Flo11-5, Klon 17 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> Die <i>FLO11A</i> -Domäne wurde in BHUM1601 entfernt und durch <i>SacII/SacI</i> Restriktionsschnittstellen ersetzt. Wurde über Whole-Vector PCR hergestellt.	diese Arbeit Maestre-Reyna <i>et al.</i> , 2012
BHUM1839	<i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator <i>FLO10A</i> (AS23-293) aus <i>S. cerevisiae</i> S288c in pET28a(+).	Maik Veelders, Vertiefungspraktikum Elisabeth Martin
BHUM1896	BHUM1760+FLO10A, Klon 14 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO10A</i> (AS23-293) aus BHUM1838.	diese Arbeit
BHUM1898	FLO5A-FLO10Subdomain_pMA-T <i>Col E1 origin, Amp^R</i> Synthetisch hergestellte <i>FLO5A</i> ^{10SD} -Domäne.	GENEART AG (Regensburg, DE)
BHUM1899	FLO10A-FLO5Subdomain_pMA-T <i>Col E1 origin, Amp^R</i> Synthetisch hergestellte <i>FLO10A</i> ^{5SD} -Domäne.	GENEART AG (Regensburg, DE)
BHUM1985	<i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>Sall-ΣFLO11SS</i> ^{AS1-31} - <i>Sp-3HA-SacII-EPA2-SacI-ΣFLO11BC</i> ^{AS214-1360} - <i>ΣFLO11T</i>	Maestre-Reyna <i>et al.</i> , 2012

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2007	pMA-T+FLO5A-G4S <i>Col E1 origin, Amp^R</i> <i>FLO5A</i> Subdomäne wurde mit Hilfe von Whole-Vector PCR durch G4S-Brücke ersetzt (<i>FLO5A^{ASD}</i>).	diese Arbeit (Bachelorarbeit Benedikt von der Heyde)
BHUM2008	pMA-T+FLO10A-G4S <i>Col E1 origin, Amp^R</i> <i>FLO10A</i> Subdomäne wurde mit Hilfe von Whole-Vector PCR durch G4S-Brücke ersetzt (<i>FLO10A^{ASD}</i>).	diese Arbeit (Bachelorarbeit Benedikt von der Heyde)
BHUM2009	BHUM1760+FLO5A, Klon 2 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO5A</i> (AS26-271) aus BHUM1441 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM1760.	diese Arbeit
BHUM2033	BHUM1760+FLO1A _{sigma} , Klon 20 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO1A_{Σ1278b}</i> (AS26-271) aus YHUM0271 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM1760.	diese Arbeit
BHUM2036	pET28a+FLO10A-FLO5SD, Klon 14 <i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator <i>FLO10A^{5SD}</i> aus BHUM1899 in Expressionsvektor pET28a(+).	diese Arbeit
BHUM2157	<i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>PGK1-Sall-ΣFLO11SS^{AS1-31}-Sp-3HA-SacII/SacI-ΣFLO11BC^{AS214-1360}-ΣFLO11T</i> <i>ΔFLOA</i> Negativkontrolle für <i>in vivo</i> Experimente	Masterarbeit Cornelia Hillenbrand
BHUM2158	<i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>PGK1-Sall-ΣFLO11SS^{AS1-31}-Sp-3HA-ΣFLO11^{AS33-213}-SacI-ΣFLO11BC^{AS214-1360}-ΣFLO11T</i> <i>FLO11A_{Σ1278b}</i> Kontrolle für <i>in vivo</i> Experimente	Masterarbeit Cornelia Hillenbrand

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2227	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2066 (Wn14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2228	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2055 (Wn3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2229	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2070 (Wn17) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2230	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2141 (Pro3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2231	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2232	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2233	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2066 (Wn14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2234	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2055 (Wn3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2235	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2070 (Wn17) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2236	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2141 (Pro3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2237	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2238	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2239	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2089 (Br3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2240	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2075 (K12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2241	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2242	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2070 (Wn17) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2243	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2141 (Pro3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2244	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2245	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2246	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2247	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2088 (Br2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2248	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2075 (K12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2249	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2250	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2066 (Wn14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2251	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2067 (Wn15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2252	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2068 (Wn16) in pJET1.2. Klon 1.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2253	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2069 (Wn27) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2254	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2071 (Wn18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2255	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2072 (Wn19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2256	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2073 (Wn20) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2257	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2091 (Wn22) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2258	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2092 (Wn23) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2259	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2093 (Wn24) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2260	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2094 (Wn25) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2261	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2063 (Wn11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2262	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2064 (Wn12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2263	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2065 (Wn13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2264	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2053 (Wn1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2265	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2054 (Wn2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2266	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2055 (Wn3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2267	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2056 (Wn4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2268	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2058 (Wn6) in pJET1.2. Klon 3.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2269	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2059 (Wn7) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2270	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2060 (Wn8) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2271	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2061 (Wn9) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2272	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2062 (Wn10) in pJET1.2. Klon 1.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2273	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2070 (Wn17) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2274	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2. Klon 3.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2275	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2088 (Br2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2276	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2089 (Br3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2277	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2142 (Br4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2278	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2074 (K11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2279	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2075 (K12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2280	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2076 (K13) in pJET1.2. Klon 4.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2281	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2077 (K14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2282	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2078 (K15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2283	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2284	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2080 (K17) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2285	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2081 (K18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2286	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2082 (K19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2287	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2084 (K111) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2288	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2136 (K113) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2289	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2137 (K114) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2290	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2138 (K115) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2291	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2140 (K117) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2292	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2293	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2294	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2141 (Pro3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2295	BHUM1985+FLO5A <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> (AS26-271) aus BHUM2009 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM2157.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2298	BHUM1985+FLO1A _{sigma} , Klon 4 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> _{Σ1278b} (AS26-271) aus BHUM2033 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2299	BHUM1985+FLO9A _{sigma} , Klon 1 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO9A</i> _{Σ1278b} (AS26-271) aus BHUM2857 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2300	BHUM1985+FLO10A, Klon 1 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO10A</i> (AS23-293) aus BHUM1896 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2452	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2456	<i>FLO9A</i> aus YHUM2142 (Br4) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2480		Eva Ackermann)
BHUM2487		
BHUM2453	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2454	<i>FLO9A</i> aus YHUM2138 (K115) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2466	BHUM2466 und BHUM2469 enthalten	Eva Ackermann)
BHUM2469	vorzeitiges Stopcodon.	
BHUM2455	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2457	<i>FLO9A</i> aus YHUM2136 (K113) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2459		Eva Ackermann)
BHUM2462		
BHUM2458	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2461	<i>FLO9A</i> aus YHUM2137 (K114) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2473	BHUM2458 und BHUM2473 enthalten	Eva Ackermann)
BHUM2486	Frameshift.	
BHUM2460	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2481	<i>FLO9A</i> aus YHUM2135 (K112) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2489		Eva Ackermann)
BHUM2491		
BHUM2463	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2464	<i>FLO9A</i> aus YHUM2095 (Wn26) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2465		Eva Ackermann)
BHUM2490		

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2467	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2468	<i>FLO9A</i> aus YHUM2144 (Br6) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2482		Eva Ackermann)
BHUM2483		
BHUM2470	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2471	<i>FLO9A</i> aus YHUM2139 (K116) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2472	BHUM2470 mit vorzeitigem Stopcodon,	Eva Ackermann)
BHUM2477	BHUM2471 enthält Frameshift.	
BHUM2474	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2475	<i>FLO9A</i> aus YHUM2140 (K117) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2476	BHUM2474 und BHUM2475 enthalten	Eva Ackermann)
BHUM2484	Frameshift.	
BHUM2478	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2479	<i>FLO9A</i> aus YHUM2143 (Br5) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2485		Eva Ackermann)
BHUM2488		
BHUM2511	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
	<i>FLO9A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2.	(Masterarbeit
		Eva Ackermann)
BHUM2512	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
	<i>FLO9A</i> aus YHUM2080 (K17) in pJET1.2.	(Masterarbeit
		Eva Ackermann)
BHUM2513	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
	<i>FLO9A</i> aus YHUM2072 (Wn19) in pJET1.2.	(Masterarbeit
		Eva Ackermann)
BHUM2514	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
	<i>FLO9A</i> aus YHUM2083 (K110) in pJET1.2.	(Masterarbeit
		Eva Ackermann)
BHUM2516	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
	<i>FLO9A</i> aus YHUM2090 (Wn21) in pJET1.2.	(Masterarbeit
		Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2517	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2082 (K19) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2518	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2089 (Br3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2519	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2088 (Br2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2520	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2521	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2522	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2523	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2094 (Wn25) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2524	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2073 (Wn20) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2525	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2063 (Wn11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2526	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2081 (K18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2527	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2066 (Wn14) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2528	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2068 (Wn16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2529	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2064 (Wn12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2530	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2071 (Wn18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2531	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2078 (K15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2532	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2077 (K14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2533	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2076 (K13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2534	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2074 (K11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2535	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2067 (Wn15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2536	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2093 (Wn24) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2537	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2092 (Wn23) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2538	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2091 (Wn22) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2539	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2139 (K116) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2540		
BHUM2541		
BHUM2542		
BHUM2543	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2135 (K112) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2544		
BHUM2545		
BHUM2546		
BHUM2547	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2136 (K113) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2548		
BHUM2549		
BHUM2550		
BHUM2551	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2137 (K114) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2552		
BHUM2553		
BHUM2554	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2140 (K117) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2555	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2142 (Br4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2556		
BHUM2557		
BHUM2558		
BHUM2559	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2143 (Br5) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2560		
BHUM2561	BHUM2561 enthält Frameshift.	

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2562	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2563	<i>FLO1A</i> aus YHUM2144 (Br6) in pJET1.2.	(Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2564	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2665	<i>FLO1A</i> aus YHUM2138 (K115) in pJET1.2.	(Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2666		
BHUM2567	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2074 (K11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2568	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2080 (K17) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2569	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2084 (K111) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2570	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2571	<i>FLO1A</i> aus YHUM2095 (Wn26) in pJET1.2.	(Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2572	BHUM2571, BHUM2572 und BHUM2573	
BHUM2573	enthalten vorzeitiges Stopcodon.	
BHUM2574	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2053 (Wn1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2575	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2054 (Wn2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2576	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2055 (Wn3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2577	<i>Amp^R, pMBI, MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2056 (Wn4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2578	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2057 (Wn5) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2579	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2058 (Wn6) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2580	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2059 (Wn7) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2581	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2060 (Wn8) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2582	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2061 (Wn9) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2583	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2062 (Wn10) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2584	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2065 (Wn13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2585	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2084 (K111) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2586 BHUM2587	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2053 (Wn1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2588	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2054 (Wn2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2589	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2056 (Wn4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2590	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2057 (Wn5) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2591	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2058 (Wn6) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2592	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2059 (Wn7) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2593	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2060 (Wn8) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2594	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2061 (Wn9) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2595	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2062 (Wn10) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2596	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2064 (Wn12) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2597	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2065 (Wn13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2598	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2067 (Wn15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2599	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2068 (Wn16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2600	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2071 (Wn18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2601	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2072 (Wn19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2602	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2073 (Wn20) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2603	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2075 (K12) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2604	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2076 (K13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2605	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2077 (K14) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2606	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2607	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2081 (K18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2608	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2082 (K19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2609	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2610	<i>FLO1A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	(Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2611	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2614	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2615	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2088 (Br2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2616	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2089 (Br3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2617	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2090 (Wn21) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2618	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2091 (Wn22) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2619	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2092 (Wn23) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2620	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2093 (Wn24) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2621	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2094 (Wn25) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2622	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2053 (Wn1) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2623	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2054 (Wn2) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2624	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2056 (Wn4) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2625	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2057 (Wn5) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2626	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2058 (Wn6) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2627	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2059 (Wn7) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2628	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2060 (Wn8) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2629	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2061 (Wn9) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2630	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2062 (Wn10) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2631	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2063 (Wn11) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2632	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2064 (Wn12) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2633	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2065 (Wn13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2634	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2067 (Wn15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2635	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2068 (Wn16) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2636	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2071 (Wn18) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2637	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2072 (Wn19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2638	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2073 (Wn20) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2639	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2074 (K11) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2640	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2076 (K13) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2641	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2077 (K14) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2643	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2078 (K15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2644	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2079 (K16) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2645	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2080 (K17) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2646	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2081 (K18) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2647	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2082 (K19) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2648	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2083 (K110) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2649	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2084 (K111) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2650	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2085 (Pro1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2651 BHUM2652	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in pJET1.2. BHUM2651 enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2653	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2654	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2088 (Br2) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2655	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2089 (Br3) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2656	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2090 (Wn21) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2657	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2091 (Wn22) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2658	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2092 (Wn23) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2659	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2093 (Wn24) in pJET1.2. Enthält Frameshift.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2660	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2094 (Wn25) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2661	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2095 (Wn26) in pJET1.2.	diese Arbeit
BHUM2662		(Masterarbeit
BHUM2663		Eva Ackermann)
BHUM2664		
BHUM2665	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2135 (K112) in pJET1.2.	diese Arbeit
BHUM2666		(Masterarbeit
BHUM2667		Eva Ackermann)
BHUM2668		

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2669	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2670	<i>FLO5A</i> aus YHUM2136 (K113) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2671		Eva Ackermann)
BHUM2672		
BHUM2673	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2674	<i>FLO5A</i> aus YHUM2137 (K114) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2675	Enthalten alle Frameshift.	Eva Ackermann)
BHUM2676		
BHUM2677	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2678	<i>FLO5A</i> aus YHUM2138 (K115) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2679		Eva Ackermann)
BHUM2680		
BHUM2681		
BHUM2682	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2683	<i>FLO5A</i> aus YHUM2139 (K116) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2684	BHUM2684 und BHUM2685 enthalten	Eva Ackermann)
BHUM2685	Frameshift.	
BHUM2686	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2687	<i>FLO5A</i> aus YHUM2140 (K117) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2688	BHUM2688 enthält Frameshift.	Eva Ackermann)
BHUM2689		
BHUM2690	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2691	<i>FLO5A</i> aus YHUM2142 (Br4) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2692		Eva Ackermann)
BHUM2693		
BHUM2694	<i>Amp^R, pMB1, MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2695	<i>FLO5A</i> aus YHUM2143 (Br5) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2696		Eva Ackermann)
BHUM2697		

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2698	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i>	diese Arbeit
BHUM2699	<i>FLO5A</i> aus YHUM2144 (Br6) in pJET1.2.	(Masterarbeit
BHUM2700	BHUM2698 enthält Frameshift.	Eva Ackermann)
BHUM2642		
BHUM2701	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2070 (Wn17) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2702	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2075 (K12) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2703	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2077 (K14) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2704	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2071 (Wn18) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2705	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2087 (Br1) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2706	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2066 (Wn14) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2707	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2086 (Pro2) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2708	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2089 (Br3) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2709	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2075 (K12) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2710	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2067 (Wn15) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2711	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2076 (K13) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2712	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> aus YHUM2084 (K111) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2713	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2075 (K12) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2714	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2073 (Wn20) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2715	<i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO9A</i> aus YHUM2087 (Br1) in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM2157.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2716	BHUM1985+FLO9A _{S288c} , Klon 15 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO9A</i> _{S288c} (AA26-271) aus YHUM1605 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2723	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO1A</i> aus YHUM2078 (K15) in pJET1.2.	diese Arbeit (Masterarbeit Eva Ackermann)
BHUM2852	BHUM1985+FLO5A-FLO10SD, Klon 1 <i>Amp^R</i> , <i>URA3</i> , <i>CEN</i> <i>FLO5A</i> ^{10SD} aus BHUM1898 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdaulichem BHUM1985.	diese Arbeit

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2853	BHUM1985+FLO5A-G4S, Klon 6 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO5A^{ΔSD}</i> aus BHUM2007 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2854	BHUM1985+FLO10A-FLO5SD, Klon 2 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO10A^{5SD}</i> aus BHUM1899 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2855	BHUM1985+FLO10A-G4S, Klon 14 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO10A^{ΔSD}</i> aus BHUM2008 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2856	BHUM1985+FLO1A _{S288c} , Klon 19 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO1A_{S288c}</i> (AS26-271) aus YHUM1605 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1985.	diese Arbeit
BHUM2857	BHUM1760+FLO9A _{sigma} , Klon 39 <i>Amp^R, URA3, CEN</i> <i>FLO9A_{Σ1278b}</i> (AS26-271) aus YHUM0271 in zuvor <i>SacI/SacII</i> verdautem BHUM1760.	diese Arbeit
BHUM2858	pET28a+FLO10A _{sigma} , Klon 8 <i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator Erweiterte <i>FLO10A</i> -Domäne (AS23-299) aus YHUM0271 um gerade Anzahl Cysteine zu erhalten. In Expressionsvektor pET28a(+).	diese Arbeit
BHUM2859	pET28a+FLO5A-G4S, Klon 2 <i>Kan^R, fl-origin, pBR322 origin, lacI</i> T7 Promotor und Terminator <i>FLO5A^{ΔSD}</i> aus BHUM2007 in Expressionsvektor pET28a(+).	diese Arbeit

Plasmidname	Vorherige Bezeichnung / Beschreibung	Referenz
BHUM2860	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2087 (Br1) in pJET1.2. Klon 2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2861	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2062 (Wn10) in pJET1.2. Klon 2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2862	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2076 (K13) in pJET1.2. Klon 3.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2863	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2068 (Wn16) in pJET1.2. Klon 2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)
BHUM2864	<i>Amp^R</i> , <i>pMB1</i> , <i>MCS</i> <i>FLO10A</i> aus YHUM2058 (Wn6) in pJET1.2. Klon 2.	diese Arbeit (Bachelorarbeit Johanna Müller)

5. Methoden

5.1 Kultivierung der Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in Flüssigmedium und je nach dem Volumen der Kultur entweder im Roll- oder auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C. Kulturen auf festem Agarmedium wurden bei der gleichen Temperatur inkubiert. Als Medium wurde immer LB-Medium verwendet. Je nach dem Resistenzmarker der Plasmide und ggf. der *E. coli*-Stämme wurde zusätzlich das entsprechende Antibiotikum / die entsprechenden Antibiotika, wie in Abschnitt 4.7 und Tab. 4.8 angegeben, dem Medium hinzugegeben.

5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Kulturen wurden in flüssigem Medium ebenfalls je nach dem Volumen der Kultur auf dem Roll- bzw. Schüttelinkubator inkubiert. Alle Kulturen in sowohl flüssigem als auch auf festem Nährmedium wurden bei 30 °C herangezogen. Als Medium wurde entweder YEPD oder SC-4 Medium verwendet. Die Selektion auf Plasmid-tragende Zellen erfolgte in SC-4 Medium durch den Auxotrophie-Marker *URA3*.

5.2 Manipulation von Nukleinsäuren

5.2.1 Isolation von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* [Hoffman and Winston, 1987]

Um genomische DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren, wurde nach der Verfahrensweise wie sie von Hoffman und Winston (1987) beschrieben wurde vorgegangen. Dabei wurde eine Kultur von 10 ml zunächst für 2 Min. bei 1520 g abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml d_4H_2O resuspendiert, in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reagiergefäß überführt, und unter den gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Nachdem auch hier der Überstand abgenommen worden war, erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Lysepuffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA),

0,2 ml Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE) und 0,3 g Glasperlen. Durch 3-4 minütiges Inkubieren auf einem Vibrax Schüttler wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen und anschließend 0,2 ml TE-Puffer hinzugegeben. Das Lysat wurde dann für 10 Min. bei 16060 g zentrifugiert, die wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Reagiergefäß überführt, 1 ml EtOH dazugegeben und durch Invertieren beide gut vermischt. Nach erneuter Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde der Überstand abgenommen. Es folgte die Zugabe von 0,4 ml TE-Puffer und 3 µl RNaseA (10 mg/ml), welche vor der erstmaligen Anwendung zuvor für 10 Min. bei 100 °C aufgeköcht worden war. Nach 5 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden zusätzlich 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml EtOH zugegeben und durch Invertieren gemischt. Zuletzt folgte eine Zentrifugation für 10 Min. bei 16060 g. Danach wurde der Überstand abgenommen, der Niederschlag an der Luft getrocknet, und in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

5.2.2 PCR Amplifikation von Nukleinsäuren

Die Amplifikation von Nukleinsäuren erfolgte je nach dem anschließendem Verwendungszweck in 20, bzw. 50 µl Ansätzen nach Angaben des Herstellers. Für analytische PCRs, beispielsweise eine Kolonie-PCR, wurden dabei jeweils 20 µl Ansätze verwendet während für Amplifikate welche weiterverwendet wurden 50 µl Ansätze eingesetzt wurden. Als Polymerase wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. benutzt. Die Wahl der PCR-Programme erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers. Je nach Art der Template-DNA, der Schmelztemperatur der Primer, und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts wurde das Programm jeweils entsprechend angepasst (Tab. 5.2). Die Schmelztemperatur der Primer wurde den Angaben des Herstellers entnommen oder nach der Wallace (2+4)-Regel berechnet. Führt eine PCR zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis wurde alternativ eine Gradienten-PCR durchgeführt.

Tab. 5.1: Die genaue Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Ingrediens	20 µl Ansatz	50 µl Ansatz	Endkonzentration
ddH ₂ O	x µl	x µl	nahezu unverdünnt
5×Phusion HF-Puffer oder 10×Pfu-Puffer mit 20 mM MgSO ₄ (beide Thermo Fisher Scientific Inc.)	4 µl 2 µl	10 µl 5 µl	1×
10 mM dNTPs	0,4 µl	1,0 µl	je 200 µM
Forward-Primer (10 µM / 20 µM)	x µl	x µl	0,5 µM
Reversed-Primer (10 µM / 20 µM)	x µl	x µl	0,5 µM
Template DNA	x µl	x µl	2-5 ng/µl
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl	0,5 µl	0,02 U/µl

Tab. 5.2: Die verwendeten PCR-Programme für die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase.

Programmschritte	Plasmid DNA	Genomische DNA	Physikalischer Schritt
30× { 98°C 98°C x °C 72°C 72°C 8°C	30 Sek.	30 Sek. - 2 Min.	Denaturierung
	10 Sek.	10 Sek.	
	x Sek.	x Sek.	Primerhybridisierung
	x Sek. (1000 bp/15 Sek.)	x Sek. (1000 bp/30 Sek.)	Elongation
	5 Min.	5 Min.	Zusätzliche Elongationszeit
	∞	∞	Verwahrung

5.2.3 DNA-Restriktion mit Hilfe von Endonukleasen

Analytische Restriktionen zur Überprüfung von Plasmiden wurden in 10-20 µl Ansätzen mit jeweils 1-10 U Endonuklease durchgeführt. Präparative Restriktionen erfolgten in 30-50 µl Ansätzen mit 20-30 U Enzym. Die Endonukleasen wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen.

5.2.4 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit 6×Loading Dye (Tab. 4.5) gemischt, so dass dieser danach einfach verdünnt vorlag. Anschließend wurden die Proben auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix der Firma Thermo Fisher Scientific Inc.. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in TAE-Puffer (Tab. 4.5) und mit Hilfe eines PowerPac™ Basic Power Supply der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH bei 120 V und 40 Min. Die Gele wurden dann für ca. 10 Min. in einem Ethidiumbromid-Färbegrad (1 µg/ml) inkubiert. Im Anschluss folgte eine weitere Inkubation für ca. 10 Min. in einem Wasserbad. Für die Visualisierung der DNA-Fragmente wurde die GelDoc™ XR der Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet.

5.2.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren zu können, wurden die Gele auf den Multiband-Transilluminator 312/365 nm-IL-20-M/L der Firma H. Saur Laborbedarf gelegt. Zuvor wurde der Transilluminator bei 365 nm für 1 Min. eingelaufen, bevor die Lichtintensität auf 70 % heruntergeschaltet und das Gel aufgelegt werden konnte. Mit einem Skalpell wurden die gewünschten Banden herausgeschnitten und auf 2 ml Reagiergefäße aufgeteilt. Danach erfolgte die Extraktion mit dem E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit der Firma Omega Bio-Tek Inc. laut Herstellerangaben. Dazu wurde zunächst das Gewicht der jeweiligen Agarosestücke bestimmt. Für jedes Gramm Agarose erfolgte die Zugabe von 1 ml „Binding Buffer“, um die Agarose während der Inkubation bei 60 °C darin zu lösen. Die Isolation der gelösten DNA wurde durch Auftragung von jeweils 700 µl auf eine HiBind® DNA Mini Column und anschließender Zentrifugation bei 10000 g für 1 Min. erreicht. Im Anschluss daran folgte nochmals die Auftragung von 300 µl „Binding Buffer“ und eine Zentrifugation bei 13000 g für 1 Min.. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 700 µl „SPW Wash Buffer“ und anschließender Zentrifugation bei 16060 g für 1 Min. gewaschen. Für die Entfernung eventueller Pufferreste folgte eine weitere Zentrifugation bei 16060 g für 2 Min.. Vor der Elution wurde die Säule mit einem frischen 1,5 ml Reagiergefäß versehen, bevor 30 µl ddH₂O aufgetragen und die Säule für 2 Min. stehen gelassen wurde. Schließlich erfolgte die Elution der DNA-Fragmente von der Säule durch Zentrifugation bei 16060 g für 1 Min..

5.2.6 DNA-Ligation

Ligationen erfolgten in einem Volumen von 10-20 µl. Darin enthalten waren das Plasmid und das Insert in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander, wobei bei der Berechnung der jeweils eingesetzten Mengen auch das Größenverhältnis berücksichtigt wurde. Außerdem wurden zusätzlich zum bereits im Ligationspuffer enthaltenen ATP nochmals 2 mM ATP (Endkonzentration) aus einer 100 mM Stocklösung zum Ansatz dazugegeben. Die Ligation erfolgte mit Hilfe von 1 U T4 DNA-Ligase der Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH oder Thermo Fischer Scientific Inc..

5.3 Manipulation von Mikroorganismen

5.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen [modifiziert nach Mandel and Higa, 1970]

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Hilfe von Calcium-Ionen wurde aus einer ü. N. Kultur eine Hauptkultur mit einer Verdünnung von 1:50 angeimpft. Zu der Hauptkultur wurden außerdem MgCl₂ und MgSO₄ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM dazugegeben und diese anschließend bei 37 °C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden dann für 10 Min. auf Eis inkubiert, für 10 Min. bei 1912 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach erfolgte die Zugabe und Resuspendierung der Zellen in 17 ml kalter RF1-Lösung (Tab. 4.5). Nach einer weiteren Inkubation für 15 Min. bei 4 °C folgte eine erneute Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden die Zellen in 2,5 ml kalter RF2-Lösung (Tab. 4.5) resuspendiert, für 30 Min. bei 0 °C inkubiert, und in jeweils 100 µl Aliquots schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte anschließend bei -80 °C.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die gefrorenen *E. coli*-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA zu den Zellen dazugegeben. Das Gemisch aus Zellen und DNA wurde dann für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 1 Min. bei 42 °C. Für die Regenerierung der Zellen erfolgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium und eine Inkubation für 1 Std. bei 37°C. Nach einer Zentrifugation für 2 Min. bei 2376 g wurde der Überstand dekantiert, die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert und auf vorgewärmtem, mit Antibiotikum/Antibiotika versetztem LB-Medium ausplattiert.

5.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen [Knop *et al.*, 1999]

Die OD_{600nm} einer ü. N. Kultur wurde zunächst gemessen und anschließend eine 50 ml Hauptkultur in YEPD mit einer Anfangs-OD_{600nm} von 0,2 angeimpft. Diese wurde bei 30 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschrunde mit jeweils 25 ml dH₂O, bzw. 5 ml SORB-Lösung (Tab. 4.5), nachdem die Zellen zuvor für 3 Min. bei 500 g abzentrifugiert worden waren. Danach erfolgte die Zugabe von 360 µl SORB-Lösung und 40 µl Heringsperm-DNA (10 mg/ml, zuvor für 10 Min. bei 100 °C inkubiert und dann in Eiswasser gekühlt). Zu jeweils 50 µl dieses Gemisches wurden 10 µl DNA hinzugegeben. Nach der Zugabe von 360 µl PEG-Lösung (Tab. 4.5) wurden die Transformationsansätze für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock für 15 Min. bei 42 °C. Zur Regeneration wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und für 1 Std. in jeweils 1 ml YEPD-Medium bei 30 °C inkubiert. Schließlich folgte die Ausplattierung der Zellen auf YEPD, bzw. SC-4-Medium. Von mehreren Kolonien wurde dann zunächst ein Vereinzelungsausstrich hergestellt, von dem wiederum eine einzelne Kolonie für die *in vivo* Tests verwendet wurde.

5.4 Analytische Methoden zur Überprüfung von Nukleinsäuren

5.4.1 Quantitative und qualitative Messung von DNA am Spektrophotometer

Nach der Aufreinigung mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid DNA Mini Kit I, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (50) oder E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit, wurde die quantitative Menge der gewonnenen DNA mit Hilfe des Spektrophotometers „Nano-Drop ND-1000“ bestimmt. Um eine Messung nach der Aufreinigung mit dem E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit möglich zu machen, wurde das Eluat zuvor nochmals für 1 Min. bei 16060 g zentrifugiert. Als Referenz für die Messung diente jeweils die Lösung, mit der die DNA zuvor von der Säule eluiert worden war. Neben der quantitativen Messung in ng/μl wurde gleichzeitig auch das Verhältnis 260nm/280nm gemessen, wobei die DNA bei einem Wert um die 1,8 als rein gilt.

5.4.2 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Je nach Art der Plasmidaufreinigung wurden verschiedene Sequenzierungsansätze vorbereitet. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des Programms Clustal X2 ausgewertet.

Tab. 5.3: Zusammensetzung der Sequenzierungsansätze nach Art der Plasmidaufreinigung.

Art der Plasmidaufreinigung	Sequenzierungsansatz
Alkalische Lyse	5,3 μl Plasmid DNA 1,0 μl Primer (20 μM) 0,7 μl 100 mM Tris-HCl pH 8,8
E.Z.N.A. [®] Plasmid DNA Mini Kit I / QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (50)	600-800 ng Plasmid DNA 1,0 μl Primer (20 μM) x μl ddH ₂ O <u>Insg. 7 μl</u>

Art der Plasmidaufreinigung	Sequenzierungsansatz
E.Z.N.A. [®] Plasmid DNA Mini Kit I / QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (50)	720-1200 ng Plasmid DNA 1 µl Primer (20 µM) x µl ddH ₂ O <u>Insg. 15 µl</u>

5.5 Stammhaltung in Glycerin-Dauerkulturen

Die dauerhafte Stammhaltung in Form von plasmidtragenden *E. coli*-Zellen erfolgte in 15 %-igem Glycerin (Endkonzentration) bei -80 °C. Dazu wurden 700 µl, bzw. 900 µl einer frischen Kultur mit dem gleichen Volumen 30 %-igen Glycerins (steril) in einer 2 ml Mikroschraubröhre (Sarstedt AG & Co.), bzw. einem CryoPure Gefäß 1,8 ml (Sarstedt AG & Co.) gemischt.

5.6 Funktionale Analyse der FloA-Domänen

5.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um das Vorhandensein des jeweiligen Flokkulinkonstrukts auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopie mit Hilfe der in Tab. 4.9 beschriebenen Antikörper durchgeführt. Dabei erfolgte die Bindung des primären Antikörpers an das dreifache, N-terminale HA-Taq, welches in den Konstrukten bereits enthalten war (Abb. 2.1). Der sekundäre Antikörper bestand aus einem IgG Antikörper der mit Cy3 verknüpft ist, welches bei einer Wellenlänge von 550 nm angeregt werden konnte und dessen Emission bei 570 nm lag. Für die Vorbereitung wurden einige Zellen aus einer Kolonie in 100 µl PBS + 2 % BSA (Tab. 4.5) gelöst. Nach einer Inkubation für 1 Std. bei 30 °C wurden diese für 2 Min. bei 380 g abzentrifugiert. Danach erfolgte die Resuspendierung in 100 µl PBS + 2 % BSA + Mouse anti-HA (1:1000) Antikörper. Nach erneuter Inkubation wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und dreimal mit jeweils 100 µl PBS + 2 % BSA gewaschen. Anschließend wurden 100 µl PBS + 2 % BSA + Goat anti-Mouse (1:1000) Antikörper zu den Zellen dazu gegeben und diese für 20 Min. bei 30 °C inkubiert. Danach wurde wieder dreimal gewaschen und die Zellen nach dem letzten

Waschschrift im Rest-Überstand resuspendiert. Für die Mikroskopie wurden 3 µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen PBS + 2 % BSA auf einem, mit 2 %-iger Agarose beschichtetem, Objektträger gemischt. Die Beschichtung erfolgte wiederum durch Lösen der Agarose in dH_2O , wovon 1 ml pro Objektträger verwendet wurde. Durch Zusammendrücken der Agarose zwischen zwei Objektträgern wurde diese verteilt. Anschließend wurde der obere Objektträger durch seitwärtiges Verschieben entfernt, und die beschichteten Objektträger mindestens über Nacht bei RT getrocknet.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit den Mikroskopen „Axiovert 200M“ und „Axio Observer.Z1“ der Firma CARL ZEISS AG. Dazu wurden jeweils die Kameramodelle „Hamamatsu ORCA-ER-1394“ und „Hamamatsu C9 100-02“ verwendet. Die Steuerung der Mikroskope und der Aufnahmen erfolgte durch die Software „Volocity 5.3.1“ (PERKIN ELMER). Für die Aufnahmen wurde ein 63× Öl-Objektiv verwendet. Die Anregung der Fluoreszenz von Cy3 erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm, während die Emission bei 570 nm beobachtet wurde. Die Belichtungszeit betrug dabei für die Aufnahmen bei Durchlicht 100 ms, und für die Fluoreszenz-Aufnahmen 80 ms. Für die anschließende Bearbeitung der Bilder in Form von Zuschneiden und Einfügen des Maßstabs wurde das Programm „Image J“ verwendet.

5.6.2 Flokkulationstest zur Verifizierung der Zell-Zell Adhäsion [Bester *et al.*, 2006]

Für die Messung der Zell-Zell Adhäsion wurde ein Flokkulationstest durchgeführt. Dazu wurden von jedem zu messenden Stamm mehrere Kolonien in jeweils 8 ml SC-4-Medium angeimpft und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Um die anfängliche OD_{600nm} der Kulturen messen zu können, erfolgte die Zugabe von 50 mM EDTA pH 8,0 (Endkonzentration). Durch Mischen wurden zunächst alle Zell-Zell Verbindungen gelöst und die OD_{600nm} gemessen. Dazu wurden jeweils 100 µl entnommen und zu 900 µl 50 mM EDTA pH 8,0 pipettiert (Messung vorher). Anschließend wurde jede Kultur auf eine OD_{600nm} von 4,0-5,5 eingestellt. Für jede Testlösung bei der das Flokkulationsvermögen gemessen werden sollte wurde dann 1 ml abgenommen. Die Aliquots wurden zunächst für 2 Min. bei 1521 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach folgte ein Waschschrift mit jeweils 1 ml sterilem dH_2O . Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit der Pipette abgenommen und jeweils 1 ml der folgenden Testlösungen dazugegeben: dH_2O , 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $CaCl_2$ / 0,2 M D-

Mannose, 10 mM CaCl₂ / 0,4 M D-Mannose, 10 mM CaCl₂ / 0,8 M D-Mannose, 10 mM CaCl₂ / 0,8 M D-Glukose. Nach dem gleichzeitigen Mischen aller Aliquots für 10 Sek. auf dem Vortexer wurden diese für 1 Min. ruhen gelassen, bevor jeweils 100 µl direkt unterhalb des Meniskus der Flüssigkeitsoberfläche entnommen wurden. Diese dienten der erneuten Messung der OD_{600nm} (Messung nachher) und der Berechnung des prozentualen Flokkulationsvermögens nach folgender Formel:

Formel II:
$$Flokkulation (\%) = \left(\frac{V-N}{V} \right) \times 100$$

5.6.3 Waschtest zur Verifizierung der Zell-Oberflächen Adhäsion [Roberts and Fink, 1994]

Um die einzelnen FloA-Domänen auf ihr Agar-Adhäsionsverhalten hin überprüfen zu können, wurden die gleichen Kolonien von den Stämmen welche bereits im Flokkulationstest verwendet wurden auf YEPD-Medium großflächig ausgestrichen. Anschließend folgte eine Inkubation für 3 Tage bei 30 °C. Danach erfolgte die weitere Inkubation bei RT für 3, bzw. 7 Tage. Alternativ wurden die Platten für 1 Tag bei 30 °C, und anschließend für 3 Tage bei RT inkubiert. Wie die Inkubation im Einzelnen durchgeführt wurde ist in den entsprechenden Abbildungen durch die Inkubationsdauer angegeben. Das Gesamtwachstum der Stämme wurde nach der Inkubation zunächst photographisch dokumentiert. Danach wurden die Platten mit dH₂O gewaschen, indem diese zunächst unter Wasser gesetzt, und anschließend ein weicher Wasserstrahl gleichmäßig über die jeweilige Platte geführt wurde. Nachdem diese dann zur Trocknung etwa 1 Std. stehen gelassen wurden, wurden die Platten erneut photographiert.

5.7 Phylogenetische Analyse von FloA-Domänen

Die phylogenetische Analyse von verschiedenen Flo1, Flo5 und Flo9 A-Domänen erfolgte mit Hilfe des Programms SeaView Version 4 (Tab. 4.2; Gouy *et al.*, 2010). Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: BIONJ Algorithmus (Gascuel, 1997), Poisson-Verteilung.

5.8 Proteinchemische Methoden

5.8.1 Bedingungen für die Proteinsynthese in *E. coli*

Die Synthese einzelner FloA-Domänen in *E. coli* erfolgte stets im 12 Liter Maßstab. Dazu wurde am Tag zuvor eine 130 ml Vorkultur in LB-Medium mit Kanamycin und Streptomycin oder Spectinomycin (Abschnitt 4.7) aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft. In 5 L Erlenmeyerkolben wurden jeweils 2 L, auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium gegeben und mit Kanamycin versetzt. Danach wurden die Kulturen 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 100 rpm bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,6 inkubiert. Die Proteinsynthese wurde mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und die Kulturen anschließend für 3 Tage bei 12 °C und 100 rpm weiter inkubiert. Nach der Synthese wurden die Zellen abzentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Proteinaufreinigung verwahrt. Die Zentrifugation erfolgte entweder mit der Standzentrifuge Sigma 4K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH) für jeweils 20 Min. bei 12 °C und 3000 g, oder mit der Sorvall RC 5B Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) für 16 Min. bei ca. 10 °C und 4225 g.

5.8.2 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen

Zu den trockenen Zellen wurde AM-Puffer bis zu einem Volumen von 30 ml dazugegeben. Darüber hinaus erfolgte die Zugabe von 0,02 mg/ml Lysozym, 0,02 mM PMSF, 0,04 mM EDTA (jeweils Endkonzentrationen) und einer Spatelspitze DNaseI (Applichem GmbH). Nachdem die Zellen in der Lösung aufgetaut und gelöst worden waren, folgte der Zellaufschluss mit Hilfe einer French Pressure Cell Press (American Instrument Company) in einem zuvor gekühlten Zylinder. Nach 3-5 Durchläufen wurde das Zelllysate in einer Beckman L7-65 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter Inc.) für 45 Min. bei 4 °C und 59457 g zentrifugiert, und der Überstand durch einen Rotilabo-Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm) filtriert.

5.8.3 Aufreinigung über His-Taq mit Hilfe einer NiNTA-Säule

Alle für die Proteinaufreinigung verwendeten Lösungen wurden zuvor filtriert und entgast. Eine NiNTA-Säule, bestehend aus einer XK16/20 Säule mit 3 ml Ni Sepharose™ High Performance (beide GE Healthcare Life Sciences), wurde vor dem Auftragen des Proteins mit Hilfe der Peristaltikpumpe Pump P-1 (Pharmacia Biotech) mit jeweils 9 ml dH₂O und AM-Puffer gespült und äquilibriert. Die Auftragung erfolgte bei 0,3 ml/min. Danach wurde nochmals mit 9 ml AM-Puffer + 15 mM Imidazol gespült, bevor die Elution des gebundenen Proteins mit Hilfe des ÄKTApurifiers (GE Healthcare Life Sciences) erfolgte. Dabei wurde ein Gradient mit einer Endkonzentration von 500 mM Imidazol in AM-Puffer verwendet. Die Durchflussrate während der Elution betrug 1 ml/min. Das Protein wurde im Fraktionskollektor Frac-920 (GE Healthcare Life Sciences) in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Säule wurde danach mit 15 ml AM-Puffer + 500 mM Imidazol, 9 ml dH₂O und 9 ml 20%-igem Ethanol gewaschen bevor sie bei 4°C gelagert wurde.

5.8.4 Aufkonzentrieren von Proteinen / Pufferwechsel

Um Proteine aufzukonzentrieren wurden diese in zuvor äquilibrierte Amicon® Ultra Zentrifugalfilter (Merck KGaA) umgefüllt und bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Nach jeweils 5 Min. wurde das Protein durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt, um eine teilweise zu hohe Konzentration zu verhindern. Protein, welches weiter aufgereinigt werden sollte, wurde auf ca. 1 ml aufkonzentriert und bei 5 °C gelagert. Für eine Umpufferung wurde bereits aufkonzentriertes Protein ($\leq 200 \mu\text{l}$) in einen äquilibrierten Amicon® Ultra-4 Zentrifugalfilter gegeben und auf 4 ml mit dem gewünschten Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde das Protein auf ca. 200 μl eingengt, nochmal auf 4 ml aufgefüllt und auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert.

5.8.5 Größensortierung von Proteinen über Gelfiltration

Für die Größensortierung von Proteinen wurde die Gelfiltrationssäule HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade, mit einer Matrix aus Dextran und Agarose, und der ÄKTApurifier

(beide GE Healthcare Life Sciences) verwendet. Zur Vorbereitung wurde das Protein weiter auf 500 µl aufkonzentriert, für 1 Min. bei 16060 g zentrifugiert, und mit einem äquilibrierten Ultrafree®-MC Zentrifugalfilter (Merck KGaA) durch erneute Zentrifugation für 1 Min. bei 16060 g gefiltert. Die Auftragung auf die äquilibrierte Säule erfolgte über eine 2 ml Probenschleife (GE Healthcare Life Sciences), welche zuvor mit jeweils 15 ml 20 %-igem Ethanol, d_4H_2O und AM-Puffer gespült worden war. Die Durchflussrate während der Gelfiltration betrug 1 ml/min. Das Protein wurde in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen und anschließend aufkonzentriert.

5.9 Proteinanalyse

5.9.1 Quantitative Analyse am Spektrophotometer

Die quantitative Messung aufgereinigter Proteine erfolgte, wie auch für Nukleinsäuren, am Spektrophotometer „Nano-Drop ND-1000“. Bei der Messung von Proteinen wurde der Probenotyp „Other Protein (E & MW)“ gewählt. Unter Eingabe des Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichtes, welche zuvor mit Hilfe des ExPASy Prot Param tool (Tab. 4.2) ermittelt wurden, konnte die jeweilige Menge der Proteine in mg/ml ermittelt werden. Als Referenz diente jeweils der Puffer, in dem das Protein gelöst war.

5.9.2 Qualitative Analyse mit Hilfe von SDS-PAGE

Zusätzlich zur Messung am Spektrophotometer wurden nach der Gelfiltration Proben aus einzelnen Fraktionen, bzw. aus bereits aufkonzentriertem Protein, auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Dazu wurden aus den Fraktionen jeweils 10 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen High-Urea (HU)-Puffer (Tab. 4.5) versetzt. Für die Auftragung von bereits aufkonzentriertem Protein wurden variable Mengen an Protein eingesetzt und ebenfalls mit dem gleichen Volumen HU-Puffer gemischt. Anschließend wurden die Proben für 10 Min. bei 65 °C inkubiert und 10 µl, bzw. die gesamte Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (Tab. 4.5) bei zunächst 100 V, bis eine einheitliche Laufront erreicht war. Die weitere Elektrophorese wurde dann bei 150 V durchgeführt bis die Laufront ca. 0,5 cm vor der unteren Kante des Gels stand. Als

Größenstandard diente der PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Fisher Scientific Inc..

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel entfernt, und das Trenngel in einer 0,25 %-igen Commassie-Blau-Färbelösung für 1 Std., bzw. über Nacht, unter leichtem Schwenken inkubiert. Zum Entfärben wurde das Trenngel mehrmals mit Entfärberlösung versetzt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Dokumentation erfolgte durch Einscannen des Gels (modifiziert nach Bennett and Scott, 1971).

5.9.3 Funktionale Analyse am Spektrofluorometer

Die funktionale Analyse mit Hilfe des Spektrofluorometers „FP-6500“ (Jasco Inc.) diente der Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) ausgewählter FloA-Domänen zu bestimmten Mono- und Disacchariden. Dies erfolgte hier unter Verwendung der intrinsischen Tryptophane, welche bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt, und deren Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 345 nm beobachtet wurde. Bindet ein Ligand in der Nähe eines Tryptophans kann es jedoch zu einem strahlungslosen Energietransfer vom Tryptophan auf den Liganden kommen, wodurch ein teilweises Erlöschen der Fluoreszenz („quenchen“) beobachtet werden kann. Für die Fluoreszenz-Spektroskopie wurden die aus *E. coli* aufgereinigten Proteine zunächst von AM-Puffer in Phosphatpuffer (Tab. 4.5) umgepuffert. Dies erfolgte vor jeder Messung mit der jeweils benötigten Menge an Protein, wobei ein geringfügiger Verlust während der Probenvorbereitung mit einberechnet wurde. Das umgepufferte Protein diente dann der Herstellung einer Ausgangslösung, welche sowohl das Protein als auch CaCl_2 in doppelt so hoher Konzentration enthielt wie sie später in den Titrationslösungen vorlagen. Diese wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Aus der Ausgangslösung wurden anschließend zwei unterschiedliche Titrationslösungen hergestellt. Für eine Einzelmessung wurden zunächst 300 μl der Ausgangslösung entnommen und mit 300 μl Phosphatpuffer gemischt (Lösung 1). Dann wurde eine weitere, individuell benötigte Menge der Ausgangslösung entnommen und mit dem gleichen Volumen einer Zuckerlösung versetzt. Die Zuckerlösung enthielt den jeweiligen Zucker in doppelt so hoher Konzentration wie er für die Titration benötigt wurde, gelöst in Phosphatpuffer (Lösung 2). Die beiden Lösungen wurden ebenfalls gut gemischt. Alle Arbeiten zur Vorbereitung der Titrationslösungen wurden mit gekühlten Lösungen

durchgeführt und die neu hergestellten Lösungen jeweils auf Eis inkubiert. Bei der Titration wurden zu 500 µl Lösung 1 bestimmte Mengen an Lösung 2 gemäß eines vorher festgelegten Pipettierschemas gegeben. Dabei wurde das Pipettierschema für nahezu jede Protein-Saccharid Kombination individuell erstellt, basierend auf Vorab-Messungen bei denen der K_d -Wert zunächst abgeschätzt wurde. Das Schema, welches anschließend für die Messungen verwendet wurde, sollte möglichst 10-Messpunkte unter und oberhalb des K_d -Wertes ergeben. Jede Protein-Saccharid Kombination wurde dreimal an jeweils unterschiedlichen Tagen gemessen. Dabei wurden die Messungen bei 10 °C und mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tab. 5.4: Endkonzentrationen des CaCl_2 und der Proteine in den beiden Titrationslösungen.

Komponente	Endkonzentration
CaCl_2	10 mM
Flo5A ^{AS23-271}	0,300 mg/ml
Flo5A ^{ΔSD}	0,150 mg/ml
Flo10A ^{AS23-299}	0,200 mg/ml
Flo10A ^{ΔSD}	0,300 mg/ml

Tab. 5.5: Die für die Fluoreszenz-Spektroskopie verwendeten Mono- und Disaccharide, sowie deren Artikelbezeichnung und Hersteller.

Mono / Disaccharid	Artikelnummer	Hersteller
α -1,2-Mannobiose	M202	DEXTRA LABORATORIES Ltd. (Reading, UK)
D-Mannose	4220.2	CARL ROTH GmbH & Co. (Karlsruhe, DE)
D-Galaktose	4987.2	
D-Glukose	6780.2	

Tab. 5.6: Die Bedingungen, unter denen die Messungen am Spektrofluorometer „FP-6500“ der Firma Jasco Inc. durchgeführt wurden.

Parameter		Erklärung
Band Width Ex + Em	5 nm	Spektrale Bandbreite vom Monochromator
Response	0,2 Sek.	Reaktionsgeschwindigkeit
Sensitivity	Medium	Detektionslimit
Excitation WL	295 nm	Anregungswellenlänge
Start	300 nm	Start der Aufzeichnung
End	400 nm	Ende der Aufzeichnung
Data Pitch	0,2 nm	Gibt das Wellenlängenintervall zur Datenaufzeichnung an
Scanning Speed	500 nm/Min.	Aufzeichnungsgeschwindigkeit
Accumulate	3	Anzahl Wiederholungen einer Messung deren Durchschnitt den Messwert angibt

Alle vor und während dieser Messungen verwendeten Pipetten waren zuvor kalibriert worden. Vor Beginn der Titration wurden 500 µl Lösung 1 zunächst für 30 Min. bei 10 °C in der Küvette unter ständigem Rühren inkubiert. Danach wurde der Rührer ausgeschaltet. Nach 30 Sek. erfolgte die Aufzeichnung des ersten Messwertes. Dann wurde eine bestimmte Menge an Lösung 2 hinzugegeben, beide Lösungen mit dem Rührer 1 Min. lang gemischt, und nach weiteren 30 Sek. der nächste Messwert ermittelt. Anschließend wurde, basierend auf den jeweils gemessenen Emissionsmaxima, der prozentuale Fluoreszenzquench ermittelt und gegen die entsprechende Konzentration des Liganden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 5“ aufgetragen. Die Berechnung des K_d -Wertes erfolgte in einem nicht-linearen Fit mit dem gleichen Program, unter Erwartung einer spezifischen Bindung an nur eine Bindungsstelle und der Verwendung von folgender Formel:

Formel I:
$$Y = \frac{Y_{\max} \times X}{(K_d + X)}$$

Y = Prozentualer Fluoreszenzquench, Y_{\max} = Maximaler Fluoreszenzquench

X = Ligandenkonzentration, K_d = Dissoziationskonstante

5.10 Kristallisation von Proteinen

5.10.1 Vorbereitung der Proteine für die Kristallisation

Vorbereitung der chimären Flo10A^{5SD}-Domäne

Für die Kristallisation von Flo10A^{5SD} (BHUM2036) wurde das aufgereinigte Protein zunächst von AM-Puffer in Flo10^{5SD}-Kristallisationspuffer (Tab. 4.5) umgepuffert, um die Wahrscheinlichkeit eines Auskristallisierens des enthaltenen NaCl's zu verringern. Anschließend wurde das Protein mit Hilfe eines Ultrafree[®]-MC Centrifugal Filters gefiltert. Da es sich dabei zunächst um das native Protein ohne Zugabe von Ca²⁺-Ionen oder Sacchariden handelte, wurde ein Teil des Proteins oder der Protein-Kristalle anschließend mit diesen Komponenten versetzt. Die Zugabe von Ca²⁺-Ionen erfolgte mit Hilfe von 50 mM CaCl₂, mit dem das Protein über Nacht inkubiert wurde. Um Proteinstrukturen mit zusätzlich gebundener D-Mannose und α -1,2-Mannobiose zu erhalten, wurden bereits vorhandene Kristalle mit einer entsprechenden Zuckerlösung inkubiert. Die Inkubation mit Mannose erfolgte dabei über Nacht, während die Inkubation mit α -1,2-Mannobiose über einen Zeitraum von 2 Tagen erfolgte.

Vorbereitung der nativen Flo10A Domäne

Die Kristallisation der nativen Flo10A^{AS23-293} (BHUM1839)-Domäne erfolgte zusammen mit D-Mannose. Dabei wurde erwartet, dass durch die Bindung von D-Mannose das Protein eine rigidere Konformation einnimmt, wodurch die Kristallisation erleichtert werden sollte. Dazu wurden 600 μ l aufgereinigtes Protein in AM-Puffer mit Flo10A-Vorbereitungspuffer (Tab. 4.5) auf 1,5 ml aufgefüllt und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Protein in einen Amicon[®] Ultra-15 Zentrifugalfilter gegeben, mit Flo10A-Kristallisationspuffer (Tab. 4.5) auf 15 ml aufgefüllt und so lange gewaschen, bis Flo10A ausschließlich in diesem Puffer vorlag. Zuletzt erfolgte die Filtrierung von Flo10A mit Hilfe eines Ultrafree[®]-MC Centrifugal Filters.

5.10.2 Auspipettieren der Proteine mit Kristallisationsbedingungen

Das Auspipettieren der Proteine zwecks Kristallisation erfolgte mit Hilfe des Roboters „Honeybee 963“ der Firma Digilab Inc. durch Dr. Holger Steuber und Ralf Pöschke vom LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie. Für das Auspipettieren der Kristallisationsansätze wurden eigens dafür vorgesehene 96-Well Innovaplaten der Firma Innovadyne Technologies Inc. verwendet. Diese enthalten neben einer Reservoir-Vertiefung zwei weitere kleinere Vertiefungen, in denen sich später jeweils ein proteinhaltiger Tropfen befindet wo die eigentliche Kristallisation nach dem „sitting drop“ Verfahren stattfindet. Die Konzentration der Proteine betrug vor dem Auspipettieren jeweils ca. 20 mg/ml. Die Kristallisationsbedingungen waren in den „JCSG Core Suites I-IV“, „JCSG+ Suite“, „Classics Suite“ und „Cryos Suite“ enthalten und wurden von der Firma Qiagen bezogen. Zunächst wurden 80 µl der Kristallisationsbedingungen in die Reservoir-Vertiefung pipettiert. Aus diesem wurden dann jeweils 300 nL mit dem gleichen Volumen der Proteinlösung gemischt. Anschließend wurden die Platten mit einer VIEWseal™-Abdeckfolie der Firma Greiner Bio-One GmbH verschlossen und bei 18 °C, bzw. 4 °C inkubiert. Die Dokumentation von eventuellem Kristallwachstum erfolgte automatisch mit Hilfe des Rock Imager 1000 der Firma Formulatrix Inc. zunächst im Abstand von einem Tag, später im Abstand von mehreren Tagen bis Wochen.

5.10.3 Röntgenbeugung und Strukturlösung

Die Datensätze, resultierend aus den erhaltenen Protein-Kristallen, wurden sowohl für Flo10A^{5SD} als auch für Flo10A mit Hilfe der Photonenquelle BESSY II am Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH aufgenommen. Das Sammeln der Datensätze wurde für Flo10A^{5SD} von Dr. Holger Steuber, damals LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie, durchgeführt. Die Datensätze für Flo10A wurden von Michael Kock aus dem Fachbereich Chemie/Biochemie (AG Essen) der Philipps-Universität Marburg aufgenommen. Die Prozessierung der Datensätze erfolgte ebenfalls durch Dr. Holger Steuber und Michael Kock in Form von „Molecular Replacement“, wobei für Flo10A^{5SD} die bereits vorhandene Struktur von Flo5A, und für Flo10A die Struktur von Flo10A^{5SD} verwendet wurde. Die Verfeinerung der so erhaltenen dreidimensionalen Strukturen wurde mit Hilfe

alternierender Runden in den Programmen REFMAC und *Coot* (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) durchgeführt.

6. Literatur

- Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D., Akada, R., Ando, Y., Harashima, S., Inoue, T., Inoue, Y., Kajiware, S., Kitamoto, K., Kitamoto, N., Kobayashi, O., Kuhara, S., Masubuchi, T., Mizoguchi, H., Nakao, Y., Nakazato, A., Namise, M., Oba, T., Ogata, T., Ohta, A., Sato, M., Shibasaki, S., Takatsume, Y., Tanimoto, S., Tsuboi, H., Nishimura, A., Yoda, K., Ishikawa, T., Iwashita, K., Fujita, N., and Shimoi, H. (2011). Whole-genome sequencing of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.7. *DNA Res* **18**: 423-34.
- Ballou, C. E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol* **185**: 440-70.
- Bauer, F.F., Govender, P., Bester, M.C. (2010). Yeast flocculation and its biotechnological relevance. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 31-9.
- Bennett, J., and Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**: 173-82.
- Berger, J., Howard, A.D., Brink, L., Gerber, L., Hauber, J., Cullen, B.R., and Udenfriend, S. (1988). COOH-terminal requirements for the correct processing of a phosphatidylinositol-glycan anchored membrane protein. *J Biol Chem* **263**: 10016-21.
- Bester, M.C., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2006). The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FLO* gene expression and Ca²⁺ -dependent flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr Genet* **49**: 375-83.
- Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., and Barre, P. (1994). Cloning and analysis of a *FLO5* flocculation gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **25**: 196-201.
- Bidard, F., Bony, M., Blondin, B., Dequin, S., and Barre, P. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* *FLO1* flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast* **11**: 809-22.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., and Cherry, J.M. (1997). Yeast as a Model Organism, *Science* **277**: 1259-60.
- Briza, P., Breitenbach, M., Ellinger, A., and Segall, J. (1990). Isolation of two developmentally regulated genes involved in spore wall maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **4**: 1775-89.
- Brückner, S., and Mösch, H.U. (2012). Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 25-58.

- Bussey, H., Kaback, D.B., Zhong, W., Vo, D.T., Clark, M.W., Fortin, N., Hall, J., Ouellette, B.F., Keng, T., Barton, A.B., et al. (1995).** The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3809-13.
- Cabib, E., and Bowers, B. (1971).** Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J Biol Chem* **246**: 152-9.
- Cabib, E., and Duran, A. (2005).** Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem* **280**: 9170-9.
- Cabib, E. (2009).** Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both $\beta(1-6)$ - and $\beta(1-3)$ glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryot Cell* **8**: 1626-36.
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., and Tanner, W. (1994).** Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and α -agglutinin. *EMBO J* **13**: 4737-44.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997).** *In silicio* Identification of Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Plasma-Membrane and Cell Wall Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477-89.
- Castaño, I., Pan, S.J., Zupancic, M., Hennequin, C., Dujon, B., and Cormack, B.P. (2005).** Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. *Mol Microbiol* **55**: 1246-58.
- Christiaens, J.F, Van Mulders, S.E., Duitama, J., Brown, C.A., Ghequire, M.G., De Meester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Voordeckers, K., and Verstrepen, K.J. (2012).** Functional divergence of gene duplicates through ectopic recombination. *EMBO Rep* **13**: 1145-51.
- Coluccio, A., Bogengruber, E., Conrad, M.N., Dresser, M.E., Briza, P., et al. (2004).** Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **3**: 1464-75.
- Conlan, R.S., and Tzamarias, D. (2001).** Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**: 1007-15.
- Cormack, B.P., Ghori, N., and Falkow, S. (1999).** An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* **285**: 578-82.
- De Freitas, J., Wintz, H., Kim, J.H, Poynton, H., Fox, T., and Vulpe, C. (2003).** Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals* **16**: 185-97.
- De Las Peñas, A., Pan, S.J., Castaño, I., Alder, J., Cregg, R., and Cormack, B.P. (2003).** Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* **17**: 2245-58.

- Deivanayagam, C.C., Wann, E.R., Chen, W., Carson, M., Rajashankar, K.R., Höök, M., and Narayana, S.V. (2002).** A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *EMBO J* **21**: 6660-72.
- Douglas, L.M., Li, L., Yang, Y., and Dranginis, A.M. (2007).** Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell* **6**: 2214-21.
- Dowell, R.D., Ryan, O., Jansen, A., Cheung, D., Agarwala, S., Danford, T., Bernstein, D.A., Rolfe, P.A., Heisler, L.E., Chin, B., Nislow, C., Giaever, G., Phillips, P.C., Fink, G.R., Gifford, D.K., and Boone, C. (2010).** Genotype to phenotype: a complex problem. *Science* **328**: 469.
- Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E., and Lipke, P.N. (2007).** A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 282-94.
- Dujon B., Alexandraki, D., André, B., Ansorge, W., Baladron, V., Ballesta, J.P., Banrevi, A., Bolle, P.A., Bolotin-Fukuhara, M., Bossier, P., et al. (1994).** Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* **369**: 371-8.
- Duntze, W., MacKay, V.L., and Manney, T.R. (1970).** *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science* **168**: 1472-3.
- Esposito, R.E., and Klapholz, S. (1981).** Meiosis and ascospore development, p. 211-287. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Fankhauser, C., Homans, S.W., Thomas-Oates, J.E., McConville, M.J., Desponds, C., et al. (1993).** Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**: 26365-74.
- Fay, J.C., and Benavides, J.A. (2005).** Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **1**: 66-71.
- Fichtner, L., Schulze, F., and Braus, G.H. (2007).** Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Mol Microbiol* **66**: 1276-89.
- Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I., and Jimenez, J. (2006).** Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11228-33.
- Fidel Jr., P.L., Vazquez, J.A., and Sobel, J.D. (1999).** *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* **12**: 80-96.
- Frieman, M.B., McCaffery, J.M., and Cormack, B.P. (2002).** Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Mol Microbiol* **46**: 479-92.

- Frieman, M.B., and Cormack, B.P. (2003).** The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol* **50**: 883-96.
- Fujita, M., and Kinoshita, T. (2010).** Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS Lett* **584**: 1670–7.
- Game, J.C. (2002).** New genome-wide methods bring more power to yeast as a model organism. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 445-7.
- Gascuel, O. (1997).** BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* **14**: 685-95.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003).** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**: 3784-8.
- Gerber, L.D., Kodukula, K., and Udenfriend, S. (1992).** Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **267**: 12168-73.
- Gerton, J. L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P.O., and Petes, T.D. (2000).** Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11383-90.
- Gietz, R. D., and Sugino, A. (1988).** New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **14**: 527-34.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**: 1077-90.
- Gimeno, C.J., and Fink, G.R. (1992).** The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**: 626.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-7.
- Goossens, K., and Willaert, R.G. (2010).** Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **32**: 1571–85.
- Goossens, K., Stassen, C., Stals, I., Donohue, D.S., Devreese, B., De Greve, H., and Willaert, R.G. (2011).** The N-terminal domain of the Flo1 flocculation protein from *Saccharomyces cerevisiae* binds specifically to mannose carbohydrates. *Eukaryot Cell* **10**: 110-7.

- Goossens, K., Ielasi, F.S., Nookaew, I., Stals, I., Alonso-Sarduy, L., Daenen, L., Van Mulders, S.E., Stassen, C., van Eijdsen, R.G., Siewers, V., Delvaux, F.R., Kasas, S., Nielsen, J., Devreese, B., Willaert, R.G. (2015).** Molecular mechanism of flocculation self-recognition in yeast and its role in mating and survival. *MBio* **6**.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010).** SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol* **27**: 221-4.
- Govender, P., Domingo, J.L., Bester, M.C., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2008).** Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6041-52.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G.R. (2000).** A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12158-63.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R. (2004).** Genetic and Epigenetic Regulation of the *FLO* Gene Family Generates Cell-Surface Variation in Yeast. *Cell* **116**: 405-15.
- Hansen, T. K., and Jakobsen, M. (2001).** Taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp. associated with blue veined cheese. *Int J Food Microbiol* **69**: 59-68.
- Hawthorne, D.C. (1963).** Directed mutation of the mating type alleles as an explanation of homothallism in yeast, p. 34-35. In *Proceedings of the 11th International Congress on Genetics*, vol. 1.
- Herskowitz, I. (1988).** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**: 536-53.
- Hicks, J. B., and I. Herskowitz, I. (1976).** Interconversion of yeast mating types. I. Direct observations of the action of the homothallism (HO) gene. *Genetics* **83**: 245-58.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-72.
- Howell, A.S., and Lew, D.J. (2012).** Morphogenesis and the cell cycle, *Genetics* **190**: 51-77.
- Hoyer, L.L., Scherer, S., Shatzman, A.R., and Livi, G.P. (1995).** *Candida albicans* *ALS1*: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Mol Microbiol* **15**: 39-54.
- Hoyer, L.L., Payne, T.L., Bell, M., Myers, A.M., and Scherer, S. (1998a).** *Candida albicans* *ALS3* and insights into the nature of the *ALS* gene family. *Curr Genet* **33**: 451-9.

- Hoyer, L.L., Payne, T.L., and Hecht, J.E. (1998b).** Identification of *Candida albicans* *ALS2* and *ALS4* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol* **180**: 5334-43.
- Hoyer, L.L., and Hecht, J.E. (2000).** The *ALS6* and *ALS7* genes of *Candida albicans*. *Yeast* **16**: 847-55.
- Hoyer, L.L., and Hecht, J.E. (2001).** The *ALS5* gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* **18**: 49-60.
- Hoyer, L.L. (2001).** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-80.
- Hoyer, L.L., Fundyga, R., Hecht, J.E., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., and Arnold, J. (2001).** Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**: 1555-67.
- Huang, G., Dougherty, S.D., and Erdman, S.E. (2009).** Conserved WCPL and CX4C domains mediate several mating adhesin interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **182**: 173-89.
- Huson, D.H., Richter, D.C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., and Rupp, R. (2007).** Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* **8**: 460.
- Ielasi, F.S., Decanniere, K., and Willaert, R.G. (2012).** The epithelial adhesin 1 (Epa1p) from the human-pathogenic yeast *Candida glabrata*: structural and functional study of the carbohydrate-binding domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**: 210-17.
- Jentoft, N. (1990).** Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**: 291-4.
- Jespersen, L., Cesar, L.B., Meaden, P.G., and Jakobsen, M. (1999).** Multiple alpha-glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl Environ Microbiol* **65**: 450-6.
- Jigami, Y. (2008).** Yeast glycobiology and its application. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 637-48.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P. (2005).** A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-84.
- Kintzer, A.F., Thoren, K.L., Sterling, H.J., Dong, K.C., Feld, G.K., Tang, I.I., Zhang, T.T., Williams, E.R., Berger, J.M., and Krantz, B.A. (2009).** The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol* **392**: 614-29.
- Klis, F.M., Boorsma, A., and De Groot, P.W. (2006).** Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Klis, F.M., Brul, S., and De Groot, P.W. (2010).** Covalently linked wall proteins in ascomycetous fungi. *Yeast* **27**: 489-93.

- Klotz, S.A., Gaur, N.K., Lake, D.F., Chan, V., Rauceo, J., and Lipke, P.N. (2004). Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infect Immun* **72**: 2029-34.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-72.
- Kobayashi, O., Suda, H., Ohtani, T., and Sone, H. (1996). Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene *FLO8* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **251**: 707-15.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H. (1998). Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* **180**: 6503-10.
- Kucharczyk, R., and Rytka, J. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*-a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochim Pol* **48**: 1025-42.
- Kurjan, J., and Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MFa): a putative a-factor precursor contains four tandem copies of mature a-factor. *Cell* **30**: 933-43.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-8.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145-75.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Nguyen Ba, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., and Louis, E.J. (2009). Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* **458**: 337-41.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741-4.
- Liu, N., Wang, D., Wang, Z.Y., He, X.P., and Zhang, B. (2007). Genetic basis of flocculation phenotype conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **7**: 1362-70.
- Lo, W.S., and Dranginis, A.M (1996). *FLO11*, a Yeast Gene Related to the *STA* Genes, Encodes a Novel Cell Surface Flocculin. *J Bacteriol* **178**: 7144-51.
- Loza, L., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Sheppard, D.C., Filler, S.G., and Edwards Jr., J.E. (2004). Functional analysis of the *Candida albicans* *ALS1* gene product. *Yeast* **21**: 473-82.

- Lussier, M., Sdicu, A.M., and Bussey, H. (1999).** The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 323–34.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1997).** MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673-84.
- Maestre-Reyna, M., Diderrich, R., Veelders, M.S., Eulenburg, G., Kalugin, V., Brückner, S., Keller, P., Rupp, S., Mösch, H.U., and Essen, L.O. (2012).** Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16864-9.
- Malcher, M., Schladebeck, S., and Mösch, H.U. (2011).** The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717–30.
- Mandel, M., and Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-62.
- McCaffrey, G., Clay, F.J., Kelsay, K., and Sprague Jr., G.F. (1987).** Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 2680-90.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nunez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.S., Cheng, G., Zhao, Z., and Wang, C.C. (2004).** Fermented beverages of pre- and proto-historic China, *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17593–98.
- Micanovic, R., Gerber, L.D., Berger, J., Kodukula, K. and Udenfriend, S. (1990).** Selectivity of the cleavage/attachment site of phosphatidylinositol-glycan-anchored membrane proteins determined by site-specific mutagenesis at Asp-484 of placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 157-61.
- Mishra, K., and Shore, D. (1999).** Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr Biol* **9**: 1123-6.
- Mitchell, A.P. (1988).** Two switches govern entry into meiosis in yeast, p. 47-66. In F. Haseltine and N. First (ed.), *Meiotic inhibition: molecular control of meiosis*. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Molano, J., Bowers, B., and Cabib, E. (1980).** Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* **85**: 199-212.
- Murphy, A., and Kavanagh, K. (1999).** Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: Implications for biotechnology. *Enzyme Microb Technol* **25**: 551-57
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., and Riezman, H. (1991).** Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **11**: 27-37.

- Nuoffer, C., Horvath, A., and Riezman, H. (1993).** Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**: 10558-63.
- Orlean, P., Arnold, E., and Tanner, W. (1985).** Apparent inhibition of glycoprotein synthesis by *S. cerevisiae* mating pheromones. *FEBS Lett* **184**: 313-17.
- Orlean, P. (1997).** Biogenesis of yeast wall and surface components, pp. 229-362 in *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cell Cycle and Cell Biology*, Vol. 3, edited by J. R. Pringle, J. R. Broach, and E. W. Jones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Pammer, M., Briza, P., Ellinger, A., Schuster, T., Stucka, R., et al. (1992).** *DIT101* (*CSD2*, *CAL1*), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast* **8**: 1089-99.
- Pan, X., and Heitman, J. (1999).** Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-87.
- Pan, X., and Heitman, J. (2002).** Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3981-93.
- Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (1997).** Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**: 833-8.
- Pittet, M., and Conzelmann, A. (2007).** Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**: 405-20.
- Ponnuraj, K., Bowden, M.G., Davis, S., Gurusiddappa, S., Moore, D., Choe, D., Xu, Y., Hook, M., and Narayana, S.V. (2003).** A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell* **115**: 217-28.
- Posas, F., and Saito, H. (1997).** Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-81.
- Rigden, D.J., Mello, L.V., and Galperin, M.Y. (2004).** The PA14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem Sci* **29**: 335-9.
- Rine, J., and Herskowitz, I. (1987).** Four Genes Responsible for a Position Effect on Expression from *HML* and *HMR* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**: 9-22.
- Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1994).** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-85.

- Robertson, L.S., and Fink, G.R. (1998).** The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13783–87.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J. (2010).** Together we are strong: cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* **27**: 531–40.
- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., and Winderickx, J. (2000).** Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* **38**: 348–58.
- Rose, M.K., Price, B.R., and Fink, G.R. (1986).** *Saccharomyces cerevisiae* nuclear fusion requires prior activation by alpha factor. *Mol Cell Biol* **6**: 3490–7.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.J., Madhani, H., and Fink, G. (1999).** MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**: 1257–1269.
- Salgado, P.S., Yan, R., Taylor, J.D., Burchell, L., Jones, R., Hoyer, L.L., Matthews, S.J., Simpson, P.J., and Cota, E. (2011).** Structural basis for the broad specificity to host-cell ligands by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15775–9.
- Schekman, R., and Brawley, V. (1979).** Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 645–9.
- Schulz, B. L., and Aepli, M. (2009).** Analysis of glycosylation site occupancy reveals a role for Ost3p and Ost6p in site-specific N-glycosylation efficiency. *Mol Cell Proteomics* **8**: 357–64.
- Silva, R.M., Miranda, I., Moura, G., and Santos, M.A. (2004).** Yeast as a model organism for studying the evolution of non-standard genetic codes. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**: 35–46.
- Sim, L., Groes, M., Olesen, K., and Henriksen, A. (2013).** Structural and biochemical characterization of the N-terminal domain of flocculin Lg-Flo1p from *Saccharomyces pastorianus* reveals a unique specificity for phosphorylated mannose. *FEBS J* **280**: 1073–83.
- Sipos, G., Puoti, A., and Conzelmann, A. (1995).** Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **270**: 19709–15.
- Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vences, M.D., Jansen, A., Prevost, M.C., Latgé, J.P., Fink, G.R., Foster, K.R., Verstrepen, K.J. (2008).** *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **135**: 726–37.
- Stratford, M., and Assinder, S. (1991).** Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**: 559–74.

- Strope, P.K., Skelly, D.A., Kozmin, S.G., Mahadevan, G., Stone, E.A., Magwene, P.M., Dietrich, F.S., and McCusker, J.H. (2015).** The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Res.* [Epub ahead of print]
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-30.
- Taylor, N.W., and Orton, W.L. (1978).** Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inst Brew* **84**: 113-14.
- Terrance, K., and Lipke, P.N. (1981).** Sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **148**: 889-96.
- Teunissen, A.W., Van Den Berg, J.A., and Steensma, H.Y. (1993).** Physical Localization of the Flocculation Gene *FLO1* on Chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 1-10.
- Teunissen, A.W., Van Den Berg, J.A., and Steensma, H.Y. (1995).** Localization of the dominant flocculation genes *FLO5* and *FLO8* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 735-45.
- Teunissen, A.W. and Steensma, H.Y. (1995).** Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**: 1001-13.
- Trueheart, J., Boeke, J.D., and Fink, G.R. (1987).** Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol* **7**: 2316-28.
- Wilkinson, L.E., and Pringle, J.R. (1974).** Transient G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae* of mating type a by a factor produced by cells of mating type a. *Exp Cell Res* **89**: 175-87.
- Van der Aa Kühle, A., Jesperen, L., Glover, R.L., Diawara, B., and Jakobsen, M. (2001).** Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeast* **18**: 1069–79.
- Van der Aa Kühle, A., and Jespersen, L. (2003).** The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Syst Appl Microbiol* **26**: 564-71.
- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2005).** In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol* **101**: 29-39.
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepren, K.J., and Delvaux, F.R. (2009).** Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 178-90.

- Veelders, M., Brückner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mösch, H.U., and Essen, L.O. (2010).** Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 22511-6.
- Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., and Fink, G.R. (2004).** Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-40.
- Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F., and Fink, G.R. (2005).** Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* **37**: 986-90.
- Verstrepen, K.J., and Klis, F.M. (2006).** Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15.
- Wojciechowicz, D., Lu, C.F., Kurjan, J., and Lipke, P.N. (1993).** Cell surface anchorage and ligand-binding domains of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol* **13**: 2554-63.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M., Grunstein, M. (2001).** TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol Cell* **7**: 117-26.
- Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., and Budroni, M. (2005).** *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2934-9.
- Zhao, H., Chen, M.H., Shen, Z.M., Kahn, P.C., and Lipke, P.N. (2001).** Environmentally induced reversible conformational switching in the yeast cell adhesion protein alpha-agglutinin. *Protein Sci* **10**: 1113-23.
- Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., and Hoyer, L.L. (2003).** Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* *ALS5*, *ALS1* and *ALS9*. *Microbiology* **149**: 2947-60.
- Zupancic, M.L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., and Cormack, B.P. (2008).** Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**: 547-59.

Ein ganz großes Dankeschön an...



Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Bereitstellung und Betreuung meines Projektes und für stets ein offenes Ohr.☺☺



Prof. Dr. Lars Oliver Essen für seine Beratung in allen biochemischen Fragen, sowie für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.☺☺



Prof. Dr. Susanne Önel und Prof. Dr. Torsten Waldminghaus für ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.☺☺



Meinen ehemaligen zu betreuenden Bachelor-Studenten Benedikt von der Heyde und Johanna Müller, sowie meiner ehemaligen Master-Studentin Eva Ackermann für die gute Arbeit. Ihr seid alle drei sehr angenehme Persönlichkeiten und es hat Spaß gemacht euch zu betreuen.☺☺



Der Arbeitsgruppe Mösch für die kreative Arbeitsatmosphäre, für heitere Spieleabende, Kinobesuche, DVD-(Themen)abende...



Dr. Holger Steuber für die erfolgreiche Zusammenarbeit in Sachen Flo10A^{5SD} Proteinstrukturen.☺☺



Der Arbeitsgruppe Essen, welche stets in allen Fragen sehr hilfsbereit war. Insbesondere möchte ich mich bei Michael Kock für die gute Zusammenarbeit bedanken, sowie für die Lösung der Flo10A-Proteinstruktur.☺☺



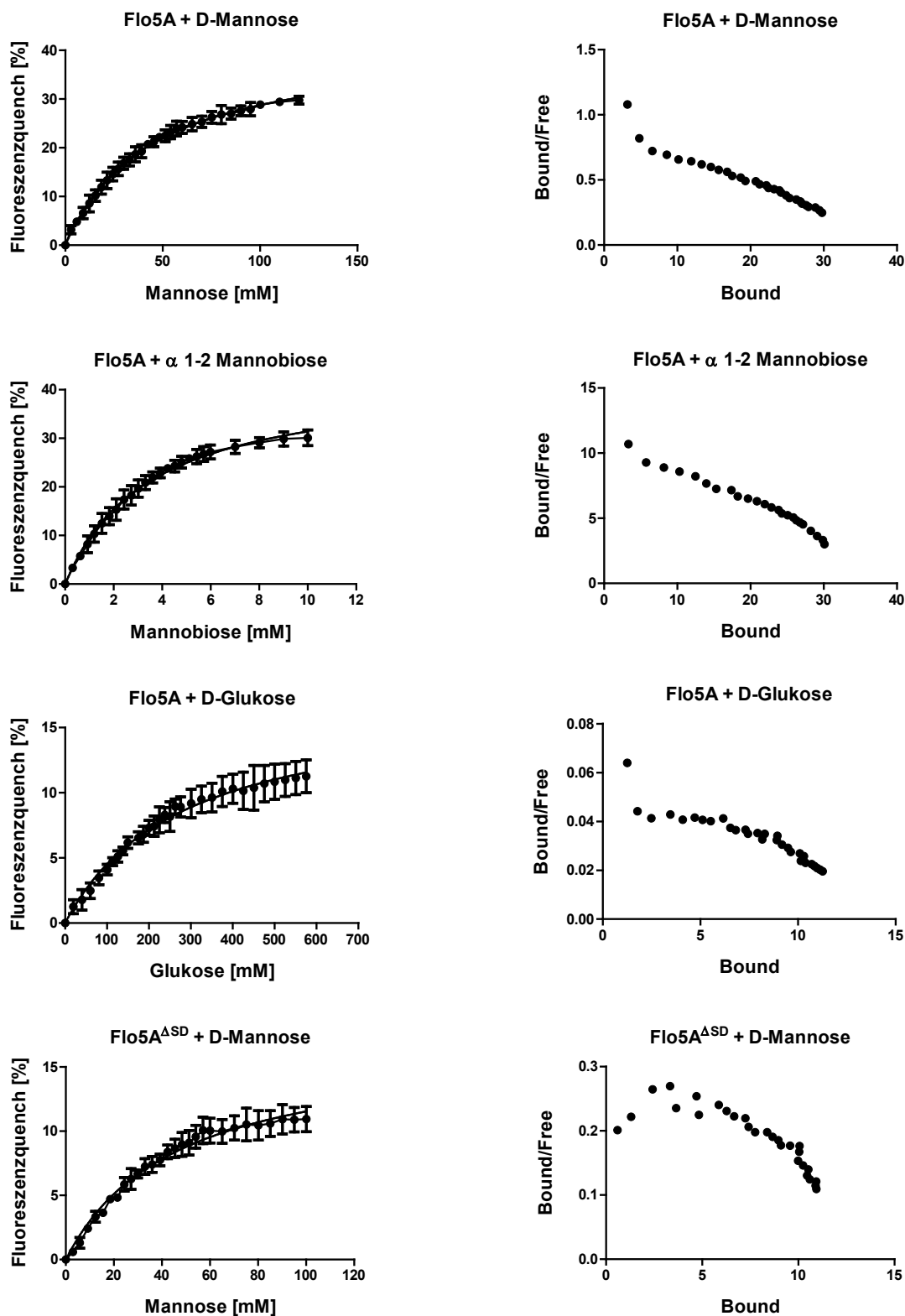
Der Arbeitsgruppe Bölker für ihre Hilfsbereitschaft und gemeinsame, unterhaltsame Betriebsausflüge.☺☺



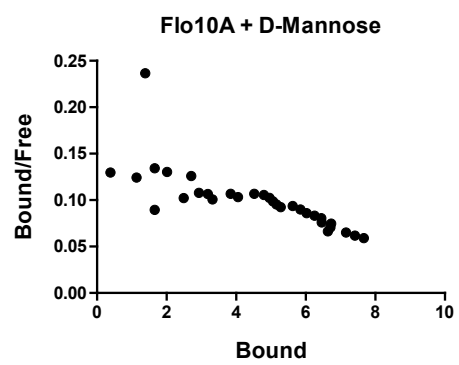
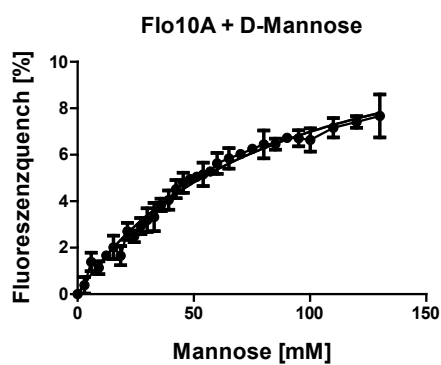
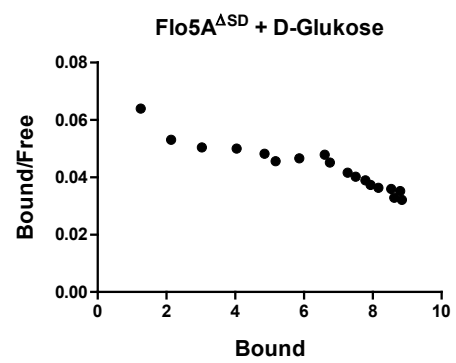
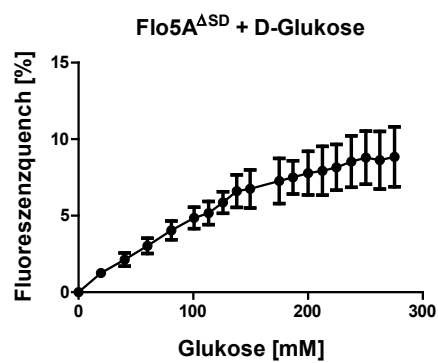
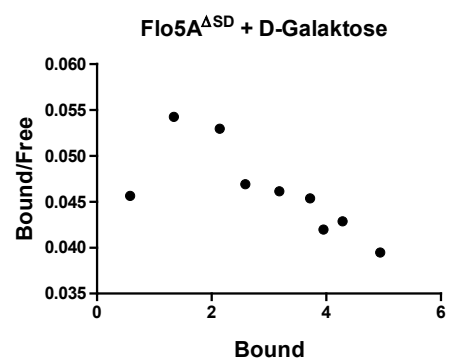
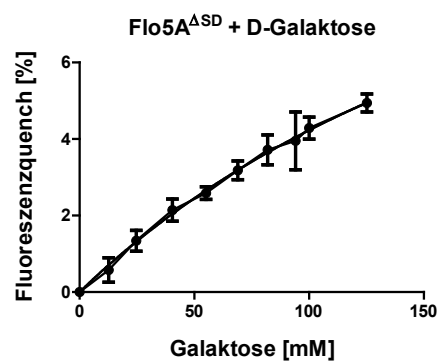
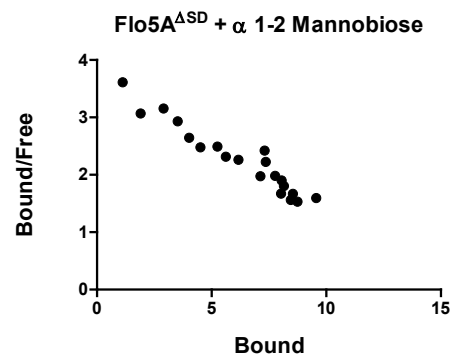
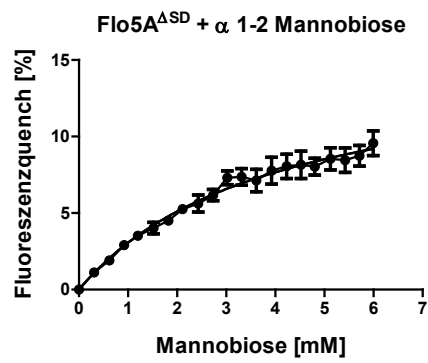
Last but not least, meiner Mutter und ihrem Lebensgefährten Frans, sowie meiner Schwester dafür, dass sie immer für mich da sind.☺☺

Die Seite 191 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

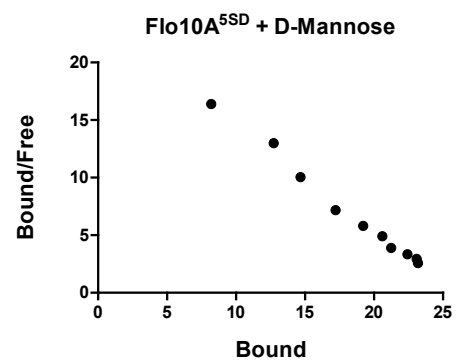
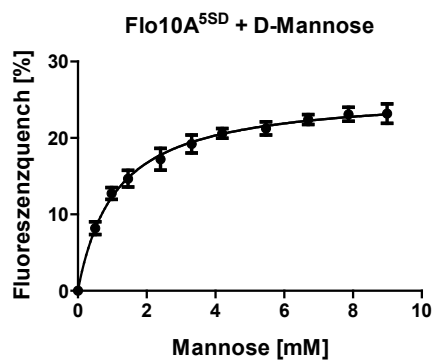
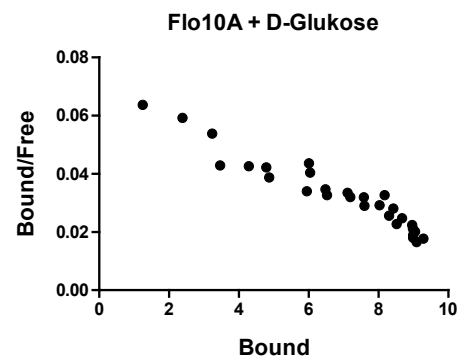
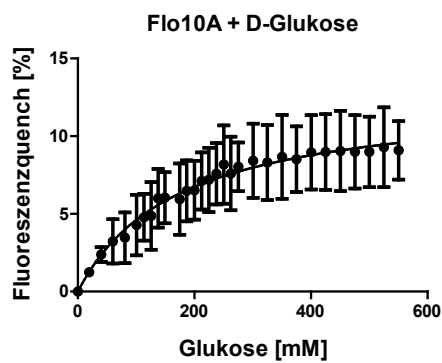
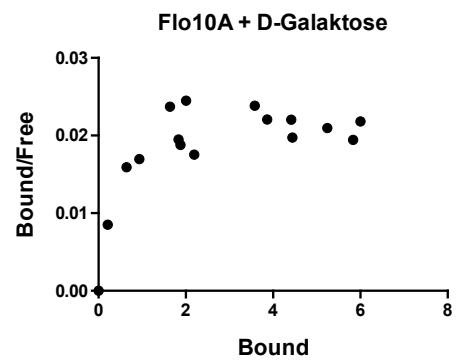
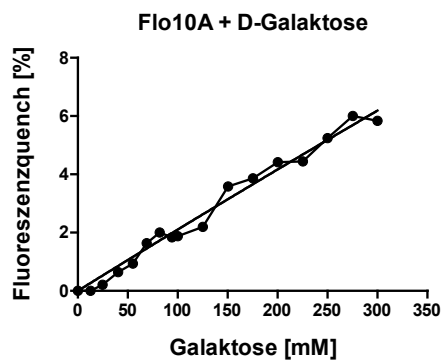
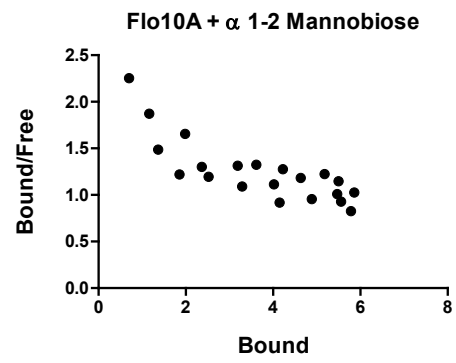
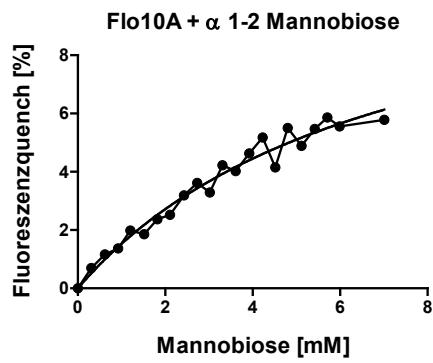
Anhang



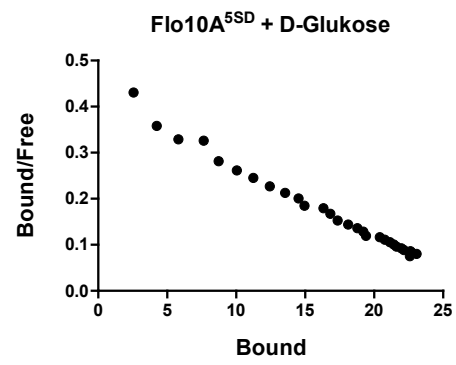
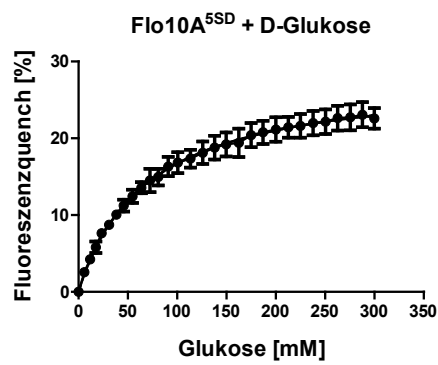
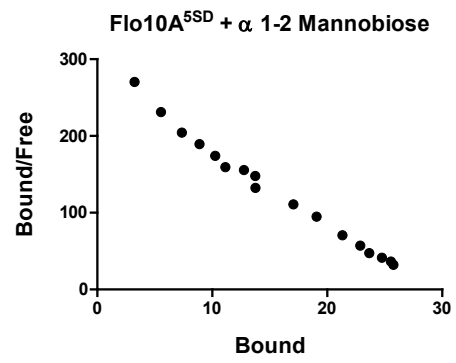
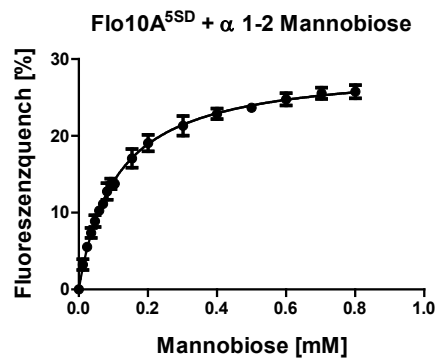
Anhang A1a: Sättigungskurven und Scatchard-Plots aus den Fluoreszenz-Spektroskopie Messungen. Links sind die aus den Fluoreszenz-Titrationen resultierenden Sättigungskurven zu sehen, mit deren Hilfe die Dissoziationskonstante K_d für jede angegebene Protein-Ligand Kombination abgeleitet wurde. Rechts sind die gleichen Werte nochmal als Scatchard-Plots aufgetragen, um deren linearen Verlauf zu überprüfen.



Anhang A1b: Fortsetzung von Anhang A1a.



Anhang A1c: Fortsetzung von Anhang A1b.



Anhang A1d: Fortsetzung von Anhang A1c.